Nachweis und Isolierung eines zweiten Strukturproteins des Bakteriophagen fr und dessen Rolle bei der Virusbildung

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Richard Herrmann

aus Nördlingen

~~1970~~

1969

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547611_0061

Nachweis und Isolierung eines zweiten Strukturproteins des Bakteriophagen fr und dessen Rolle bei der Virusbildung

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
der Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
Richard Herrmann
aus Nördlingen

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung : 18.12.1969

Dekan : Prof. Dr. A. Seilacher

1. Berichterstatter : Priv. Doz. Dr. A. Anderer

2. Berichterstatter : Prof. Dr. H. Auterhoff

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Professor Dr. G. Schramm, danke ich für die interessante Themenstellung, die großzügigen Arbeitsbedingungen an seinem Institut und für seine stetige Bereitschaft, durch Rat und Aufmunterung die Arbeit zu fördern.

Mein Dank gilt auch Herrn Priv.-Doz. Dr. F.A. Anderer, der sich sofort nach dem Tode von Herrn Prof. Dr. G. Schramm bereit erklärt hat, die Leitung der Arbeit zu übernehmen, und mir mit vielen Ratschlägen zur Seite gestanden hat.

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A.	EINLEITUNG	5
B.	ERGEBNISSE	11
I.	Lokalisierung des A-Proteins	
	1. Einbau von ^{3}H-Histidin in fr-Phagen	11
	2. Bestimmung der Zahl der A-Proteine pro Phage	14
II.	Isolierung und physikalische Charakterisierung des A-Proteins	
	1. Spezifische Markierung von A-Protein und Hüllprotein	16
	2. Wahl einer geeigneten Trennmethode	17
	3. Spaltung des Phagen in seine Einzelkomponenten und Abtrennung des A-Proteins	19
	4. Molekulargewichtsbestimmung des A-Proteins	26
	5. Präparative Isolierung des A-Proteins	29
III.	Rolle des A-Proteins bei der Virusbildung	
	1. Rolle des A-Proteins bei der Reaggregation leerer Proteinhüllen	34
	a) Essigsäurespaltung des Phagen und Reinigung des Hüllproteins	35
	b) Bildung der künstlichen leeren Proteinhüllen	37
	c) Charakterisierung der Proteinhüllen durch Sedimentationsverhalten	4o
	d) Abhängigkeit der Hüllenbildung von Proteinkonzentration, pH-Wert, Temperatur, Ionenstärke und Zeit	43
	e) Elektrophoretisches Verhalten der Proteinhüllen	47
	f) Antigene Eigenschaften der Proteinhüllen	48
	2. Rolle des A-Proteins bei der Rekonstitution von infektiösen Phagen	51

Seite

C. ZUSAMMENFASSUNG 57
D. DISKUSSION 58
E. MATERIAL UND METHODEN
1. Bakterienstämme und Bakteriophagen 62
2. Medien und Puffer 62
3. Chemikalien und biochemische Präparate 62
4. Präparation von fr-Phagen 63
5. Präparation von radioaktiv markierten Phagen
a) ^{3}H-Histidin-Phagen 64
b) ^{32}P- und ^{35}S-markierte Phagen 65
6. Acrylamidgelelektrophorese
a) 7,5%iges Acrylamidgel für analytische Trennung bei pH 7,2 65
b) 5%iges Acrylamidgel für analytische Trennung bei pH 11,5 66
c) 7,5%iges Acrylamidgel für präparative Isolierung 66
7. Spaltung des Phagen für analytische Trennung auf Gelelektrophorese 67
8. Spaltung des Phagen für Isolierung des A-Proteins 67
9. Isolierung des A-Proteins 68
10. Essigsäurespaltung der Phagen nach FRAENKEL-CONRAT und Bildung der leeren Hüllen 68
11. Messung der elektrophoretischen Beweglichkeit von Phagen und leeren Hüllen 69
12. Bestimmung der Antikörper-Bindungskapazität von Phagen und leeren Hüllen 70
13. Rekonstitutionsversuche von infektiösen Phagen 70
14. fr-RNS-Präparation 71
15. CsCl- und Rohrzuckergradienten 72
16. Messung der Radioaktivität 73
17. Elektronenmikroskopie 73
F. LITERATURVERZEICHNIS 74

Abkürzungen :

DNS	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
PFU	Plaque-forming-unit
Phage	Bakteriophage
Phosphatpuffer	Natriumphosphatpuffer
pm^+ Bakterium	permissive Bakterium
pm^- Bakterium	non-permissive Bakterium
RNS	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOS	Natriumoctylsulfat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

A. EINLEITUNG

Chemotherapeutika spielen bei der Behandlung von Infektionskrankheiten eine bedeutende Rolle. Gegen bestimmte Arten von Mikroorganismen konnten jedoch noch keine wirksamen Chemotherapeutika entwickelt werden. Besonders bei der Behandlung von Viruskrankheiten hat man bis heute nur vergleichsweise geringe Erfolge zu verzeichnen. Die Viren nehmen unter den Mikroorganismen eine Sonderstellung ein, da sie über keinen eigenen Stoffwechsel verfügen. Bei ihrer Vermehrung sind sie deshalb auf den Stoffwechsel einer geeigneten Wirtszelle angewiesen. Obwohl es eine Reihe von chemischen Verbindungen mit guter virostatischer Wirkung gibt, können diese therapeutisch meistens nicht verwertet werden, weil sie nicht nur virusspezifisch angreifen, sondern gleichzeitig auch die Wirtszelle schädigen.
So werden zur Zeit in der Humanheilkunde nur die folgenden Substanzen verwendet (1) :
Isatin -β- Thiosemicarbazon bei Pockenviren,
1 - Adamantanamin - Hydrochlorid bei Influenzaviren und Pyrimidinderivate bei herpetischen Augeninfektionen.
Durch 1 - Adamantanamin - Hydrochlorid wird die Penetration des Viruspartikels in das Zytoplasma gehemmt.
Isatin -β- Thiosemicarbazon verhindert die Reifung des Virus.

Beide Chemotherapeutika wirken also virusspezifisch. Die Pyrimidinderivate sind gegenüber den Pyrimidinverbindungen, die als Bausteine von RNS und DNS verwendet werden (Uracil, Thymin, Cytosin), durch Einführung von Halogenen, einer Nitro- oder Methylgruppe chemisch verändert. Sie werden als Antimetabolite (z.B. 5-Jod-2-desoxyuridin) sowohl in die Nukleinsäure der Wirtszelle als auch in die Nukleinsäure des Virus eingebaut. In beiden Fällen wird dadurch die korrekte Synthese neuer Nukleinsäuren verhindert, d.h. der Krankheitserreger und der Wirt werden in gleicher Weise geschädigt. Die Anwendung der Pyrimidinderivate muß deshalb auf Infektionen beschränkt werden, bei denen das kranke Gewebe lokal behandelt werden kann (2).

Die systematische Entwicklung neuer virusspezifischer Chemotherapeutika setzt eine detaillierte Kenntnis des Aufbaues und der Biosynthese von Viren voraus. Den gegenwärtig erfolgversprechendsten experimentellen Ansatzpunkt bieten Untersuchungen an einfachen Viren. Diese Viren besitzen eine regelmäßige Struktur, ihre Hauptkomponenten sind Nukleinsäure und Hüllprotein (3). Von den einfachen Viren ist die Biosynthese der Bakteriophagen, das sind Viren, die Bakterien als Wirtszelle benutzen, am besten zu übersehen. Die bisher in der Litera-

tur beschriebenen Analogien zu humanpathogenen Viren (z.B. Poliovirus) rechtfertigen dieses Vorgehen.

Als Basis für gleichartige Untersuchungen an human-, oder tierpathogenen Viren wurde die vorliegende Arbeit an dem Bakteriophagen fr durchgeführt.
Der fr-Phage gehört zu einer Gruppe von kleinen RNS-Phagen (f2, R17, MS2, M12), die alle in ihrer Zusammensetzung und in ihrem biologischen Verhalten weitgehend übereinstimmen (4, 5). Man kann deshalb die Ergebnisse, welche an den verschiedenen RNS-Phagen gewonnen wurden, austauschen.
Die Vermehrung des fr-Phagen erfolgt ausschließlich in F^+- und Hfr-Stämmen von Escherichia coli (6). Nur sie besitzen die für die Anheftung der Phagen-RNS notwendigen Rezeptoren (F-Pili) (7, 8). Das Molekulargewicht des Phagen beträgt 4×10^6 (9) und der Durchmesser 265 Å (10). Der Phage besteht zu 70 % aus Protein und zu 30 % aus Ribonukleinsäure. Die Nukleinsäure ist einsträngig, linear und etwa 1 µ lang. Dem Molekulargewicht der RNS von $1{,}1 \times 10^6$ (11) entspricht eine Nukleotidzahl von 3 300 bis 3 600. Eine solche RNS kann für Peptidketten mit einer Gesamtlänge von 1 100 bis 1 200 Aminosäuren codieren.

Als die vorliegende Arbeit begonnen wurde, waren neben der Nukleinsäure nur das Hüllprotein als Strukturbestandteil des Phagen bekannt. Die Peptidkette des Hüllproteins hat ein Molekulargewicht von 13 75o. Sie besteht aus 129 Aminosäuren, deren Reihenfolge ebenfalls aufgeklärt ist (12). 18o dieser Hüllproteinmoleküle bilden die Proteinhülle eines Phagen. In der Wirtszelle wird neben dem Strukturprotein eine virusspezifische RNS-Replicase synthetisiert (13, 14, 15, 16), die für die Replikation der Phagennukleinsäure notwendig ist.

HEISENBERG bewies an Hand von Ergebnissen, die er bei der Untersuchung des Vermehrungszyklus einer Amber-Mutante des Phagen erzielte, die Existenz eines dritten Genes (17, 18). Diese Amber-Mutante bildet bei der Vermehrung in pm^--Bakterien nur nicht infektiöse phagenähnliche Partikel. Diese "defekten" Partikel adsorbierten weder an pm^--Bakterien noch an pm^+-Bakterien und besaßen etwa ein Drittel weniger RNS als der Wildtyp, obwohl aus infizierten pm^--Zellen infektiöse RNS isoliert werden konnte.
Bei der Verwendung einer RNase-freien pm^--Wirtszelle entstanden dagegen andere nicht infektiöse, "schwere defekte" Partikel mit vollständiger RNS, die sich durch RNase-Behandlung in "defekte" Partikel umwandeln ließen.

Diese enthielten wiederum nur zwei Drittel der RNS. Da bei der Infektion des pm⁻-Bakteriums mit der Amber-Mutante intaktes Hüllprotein synthetisiert wurde, mußte die Mutation der Mutante in einem neuen dritten Gen liegen. HEISENBERG postulierte die Mitwirkung dieses virusspezifischen Genproduktes bei der Synthese der Viruspartikel. Der Faktor sollte für die richtige Anordnung der Virus-RNS im Phagen verantwortlich sein.

Im wesentlichen bestätigten ARGETSINGER und GUSSIN (19, 2o) die Ergebnisse von HEISENBERG am Phagen R17. Sie fanden ebenfalls ein neues Gen, das sie A-Gen nannten. Bei Mutationen im A-Gen wurde auch hier die Bildung defekter Partikel beobachtet. Sie nannten das Genprodukt des A-Genes A-Protein (attachment organelle). Im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit wird die Bezeichnung A-Protein auch für das Genprodukt des von HEISENBERG am fr-Phagen entdeckten neuen Genes übernommen.

Welche Rolle das A-Protein bei der Bildung der Phagen spielt, kann am besten durch in vitro-Rekonstitution des Phagen aus den Einzelkomponenten beantwortet werden. Nach einem Modell von CASPAR und KLUG (3), das sie in einer Reihe von Arbeiten entwickelten und begründeten, werden einfache Viren, die nach definier-

ten Symmetrieprinzipien aufgebaut sind, durch eine selbstgesteuerte Aggregation (self-assembly) gebildet. Experimentell wurde diese Vorstellung zuerst an stäbchenförmigen Viren bestätigt (21, 22, 23). Die Gültigkeit dieses Modells für kubische Eikosaeder bewies HOHN, als er in vitro aus isolierter fr-RNS und gereinigten fr-Hüllproteinfraktionen nicht infektiöse Partikel erhielt (24), die in ihren physikalischen Eigenschaften mit den "schweren defekten" Partikeln von HEISENBERG übereinstimmten. Es liegt nahe, dass auch in diesem Fall das Fehlen des A-Proteins die Bildung adsorptionsfähiger, infektiöser Phagenpartikel verhindert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, Struktur und Funktion des A-Proteins zu ermitteln. Folgende Fragen sollten beantwortet werden :

1. Bestehen die fr-Phagen nur aus Hüllprotein und Nukleinsäure ? Ist das A-Protein ein integraler Bestandteil des infektiösen Partikels oder ist seine Anwesenheit nur bei der Virusreifung nötig ?
2. Kann man das A-Protein isolieren ? Welche Aufgaben erfüllt es beim Aufbau des Phagen aus Hüllproteinuntereinheiten und RNS ?

B. ERGEBNISSE

I. Lokalisierung des A-Proteins

1. Einbau von ^{3}H-Histidin in fr-Phagen

Außer den Ergebnissen von genetischen Experimenten erhärteten besonders Befunde von NATHANS et al. (25) und VINUELA (26) die Vermutung, daß während der Biosynthese des Phagen noch ein drittes Protein gebildet wird. Bei Versuchen, radioaktives Histidin in die Proteine einzubauen, die in Actinomycin vorbehandelten Protoplasten von E. coli synthetisiert werden, konnten zwei verschiedene, Phagen-RNS-codierte, histidinhaltige Proteine nachgewiesen werden. Auch in einem in vitro-System aus zellfreien E. coli-Extrakten wurden unter Verwendung von Phagen-RNS als Messenger-RNS diese beiden histidinhaltigen Proteine synthetisiert (27). Während ein Protein als Replicase identifiziert wurde, wußte man bisher nichts von der Existenz und Funktion des zweiten Proteins. Da bei der Sequenzanalyse der Hüllproteine der verschiedenen RNS-Phagen einschließlich des fr-Phagen nie Histidin gefunden wurde, konnte man sicher ausschließen, daß dieses zweite Protein mit dem Hüllprotein identisch ist (12, 28, 29, 3o, 31). Es lag vielmehr die Vermutung nahe, daß das A-Protein und dieses zweite Protein ein und dasselbe sind.

Als Voraussetzung für alle weiteren Untersuchungen mußte zuerst geklärt werden, ob die Synthese des gesuchten Proteins nur in der Wirtszelle induziert wird und dieses dort seine Funktion erfüllt, oder ob das Protein in den Phagen eingebaut wird.
Um diese Frage zu beantworten, nutzt man die Möglichkeit durch radioaktiv markiertes Histidin das gesuchte Protein spezifisch zu kennzeichnen. Dazu wurde der Phage bei seiner Vermehrung in einem Medium gezüchtet, das ^{3}H-Histidin enthielt. Trotz mehrfacher Reinigung der Phagen durch Ammoniumsulfatfällung und mehrere gemischte Rohrzucker-Caesiumchlorid-Gradienten (Abb.1) wurde nach einer Trichloressigsäure-Fällung im Sediment, das nur noch gereinigte Phagen enthalten konnte, Radioaktivität gefunden, die nur durch den Einbau radioaktiven Histidins in den Phagen erklärt werden konnte.

Durch den Einbau von ^{3}H-Histidin in die Phagen wurde zweifelsfrei nachgewiesen, daß neben dem Hüllprotein noch ein histidinhaltiges Protein Bestandteil des Phagen ist. Dieses histidinhaltige Protein wird im weiteren Verlauf der Arbeit nach ARGETSINGER und GUSSIN A-Protein genannt.

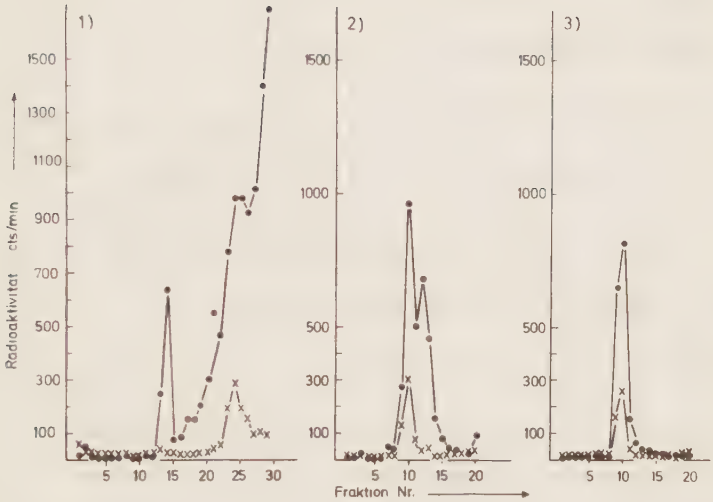


Abb. 1 :
Reinigung von ^{3}H-Histidin (●—●—●) und ^{32}P (x—x—x) doppelt radioaktiv markierten fr-Phagen über 3 gemischte Rohrzucker-CsCl-Gradienten (siehe MATERIAL UND METHODE). Die ^{32}P-Radioaktivität markiert die Position der Phagen im Gradienten. Die Fraktionen Nr. 24 und 25 werden in einem 2. Gradienten und die Fraktion Nr. 1o des 2. Gradienten in einem 3. Gradienten nachgereinigt. Fraktion Nr. 1o des 3. Gradienten enthält die gereinigten ^{3}H-Histidin-Phagen.

2. Bestimmung der Zahl der A-Proteine pro Phage

Alle Sequenzanalysen der Hüllproteine der RNS-Phagen wurden durchgeführt, bevor man das A-Protein als zweites Strukturprotein der RNS-Phagen kannte. Trotzdem wurde bei diesen Analysen niemals Histidin gefunden. Man darf daraus schließen, daß die Zahl der A-Proteine im Phagen relativ klein sein muß. Da aber die Kenntnis dieser Zahl Hinweise auf eine mögliche Funktion des A-Proteins geben kann, wurde die Zahl der A-Proteine pro Phage in folgender Weise ermittelt :
Zunächst wurde durch Doppelmarkierung der Phagen mit radioaktivem Phosphor und radioaktiv markiertem Histidin errechnet, wieviel Histidinmoleküle in einen Phagen eingebaut werden. Da nur die Nukleinsäure Phosphor enthält, und man die Zahl der Nukleotide der Phagen-RNS kennt, ist der ^{32}P-Einbau ein Maß für die Anzahl der synthetisierten Partikel. Voraussetzung für dieses Vorgehen ist die Verwendung eines definierten Mediums und die Kenntnis der spezifischen Aktivitäten von $^{32}PO_4$ und ^{3}H-Histidin.
Bei einem Versuch waren im Medium die spezifischen Aktivitäten (s.A.) von Histidin 2 x 10^9 cts/min $^{3}H/\mu mol$ und von Phosphat 2,8 x 10^6 cts/min $^{32}P/\mu mol$; das Verhältnis s.A. Histidin : s.A. Phosphat ergab also 693. In einem hochgereinigten Phagenpräparat betrug dieses Verhältnis noch o,98. Daraus errechnet sich ein

Histidin- : Phosphatverhältnis im Phagen von 1 : 7o5, d.h. in einem fr-Phagen mit einer RNS von 3 6oo Nukleotiden (= 3 6oo P) findet man 5,1 Moleküle Histidin. In einem zweiten Versuch wurden 4,75 Moleküle Histidin pro Phage errechnet.

In einer Phagenpopulation treffen also auf einen Phagen 5 Histidinmoleküle. Übernimmt man den Wert von ARGETSINGER-STEITZ, die beim R17 5 Moleküle Histidin pro ein Molekül A-Protein gefunden hat (32), wird im Durchschnitt ein A-Protein in einen fr-Phagen eingebaut.

II. Isolierung und physikalische Charakterisierung des A-Proteins

1. Spezifische Markierung von A-Protein und Hüllprotein

Da der Phage zwei Proteine enthält, muß für den Nachweis einer einwandfreien Trennung der beiden Proteine und für die Isolierung des A-Proteins, jedes der beiden Proteine spezifisch gekennzeichnet werden. Die spezifische Markierung ermöglicht es, die Qualität der Trennung zu überprüfen und während der Isolierung des A-Proteins den Gehalt an Verunreinigung durch Hüllprotein zu bestimmen.

Die einfachste Methode Protein spezifisch zu markieren besteht darin, während der Biosynthese der Viren der Wirtszelle unterschiedlich radioaktiv markierte Substanzen anzubieten, die selektiv in die Proteine eingebaut werden. Auf diese Weise wurde das A-Protein mit ^{3}H-Histidin gekennzeichnet (siehe I./1.).

Zur Markierung des Hüllproteins wurden die Phagen in einem Medium gezüchtet, das ^{35}S als Sulfat enthielt. Der radioaktive Schwefel wird statistisch in die schwefelhaltigen Aminosäuren (Cystein, Methionin) eingebaut; diese werden dann bei der Synthese der Peptidketten verwendet. Das Hüllprotein des Phagen enthält zwei Cysteine und Methionine pro Molekül (12). Bei dem großen Überschuss an Hüllprotein gegenüber A-Protein

sollte fast ausschließlich das Hüllprotein ^{35}S-markiert sein. Eine Gelelektrophorese mit ^{35}S-markierten Phagen bestätigte diese Überlegung (Abb. 3 und 4).
Man erhält also durch den Einbau von radioaktivem Histidin und radioaktivem Sulfat in den Phagen eine spezifische Markierung des Hüllproteins und des A-Proteins.

2. Wahl einer geeigneten Trennmethode

Die bisherigen Befunde über das A-Protein und die Aufgabe, A-Protein in präparativem Maßstab zu isolieren, bestimmten die Wahl der Trennmethode. Die Methode sollte es ermöglichen, im analytischen Maßstab die geeigneten Bedingungen für eine Trennung zu finden, die sich direkt auf eine Isolierung des A-Proteins im präparativen Maßstab übertragen ließen. Dabei mußte man berücksichtigen, dass das A-Protein nur in relativ geringer Konzentration vorliegt. Trotz radioaktiver Markierung konnten Schwierigkeiten beim Nachweis des A-Proteins dann auftreten, wenn die Proteinlösung stark verdünnt wird, wie es bei der Elution von Chromatographiesäulen geschieht.

Versuche, durch Säulenchromatographie an Ionenaustauschern oder den Molekularsieben Biogel und Sephadex A-Protein zu isolieren, blieben erfolglos.

Die Nachteile der Methode waren folgende :

1) Für einen Versuchsansatz mußten zu viele ^{3}H-Histidin-Phagen angesetzt werden,
2) während der Elution von der Säule wurde das A-Protein stark verdünnt,
3) die Verluste an A-Protein während der Aufarbeitung waren ungewöhnlich hoch.

Bei diesen Versuchen fiel auf, dass das A-Protein offensichtlich von allen Oberflächen, wie Glaswänden, Membranen von Dialyseschläuchen usw., stark adsorbiert wird.

Als eine geeignete Methode erwies sich schließlich die Elektrophorese in Acrylamidgel. Bei diesem Verfahren erzielt man ein gutes Auflösungsvermögen durch Kombination des Molekularsiebeffektes mit dem Effekt der Ladungsdifferenz der Proteine. Entsprechend dem Gehalt an Acrylamid können Gele verschieden großer Porenweite hergestellt werden. Die Gele sind innerhalb eines weiten pH-Bereiches zu verwenden. Acrylamid polymerisiert sowohl in 3o%iger Essigsäure als auch in alkalischen Lösungen von pH 11,5 zu brauchbaren Gelen. Sehr vorteilhaft ist, dass die Substanzen nicht sehr konzentriert aufgetragen werden müssen, da während der Elektrophorese zunächst eine Konzentrierung der zu trennenden Substanzen erfolgt. Die Methode läßt sich im analytischen Maßstab mit µg-Mengen als auch im präparativen Bereich bis zu

1oo mg anwenden. Für die Trennung von A-Protein und Hüllprotein wurden Gele benutzt, die 5 - 7,5% Acrylamid enthielten. Diese Gele eignen sich besonders zur Trennung von Molekülen mit Molekulargewichten zwischen 1o ooo und 1oo ooo. Versuche, die beiden Proteine nach entsprechender Vorbehandlung (siehe II./3.) bei pH-Werten zwischen pH 3 und pH 11,5 abzutrennen, verliefen alle erfolgreich. Lediglich die Trennschärfe und die Dauer der Elektrophorese variierten bei den verschiedenen pH-Werten. Bedingungen, wie sie SHAPIRO et al. (33) verwendeten, um Molekulargewichte von Proteinen mit der Gelelektrophorese zu bestimmen, erwiesen sich jedoch als optimal. Die Elektrophorese erfolgte bei pH 7,2. Durch Zugabe von 1 % bzw. o,1 % Natriumdodecylsulfat (SDS) zum Protein werden die Ladungsunterschiede zwischen den Proteinen in einem Phosphatpuffer pH 7,2 so stark verringert, daß die Trennung nur noch nach Molekulargröße erfolgt. Alle Proteine laufen in diesem Puffer zur Anode.

3. Spaltung des Phagen in seine Einzelkomponenten und Abtrennung des A-Proteins

Bevor die Proteine auf der Gelelektrophorese getrennt werden können, müssen die Phagen in ihre Einzelkomponenten gespalten werden. Bei der Gelelektrophorese sollten die Proteine in monomerem Zustand vorliegen,

da sonst mit der beschriebenen Methode einwandfreie Trennungen nicht zu erwarten sind. Wir entschlossen uns, den Phagen durch Dialyse gegen alkalische Puffer zu spalten. Die dabei gemachten Erfahrungen seien kurz zusammengefaßt :

Dialysiert man fr-Phagen gegen Puffer mit pH-Werten zwischen pH 1o,5 und pH 12, treten in Abhängigkeit von der Ionenkonzentration Spaltprodukte verschiedener Größe auf. Als Maß für die Größe der Spaltprodukte wurde deren Sedimentationskonstante s_o bestimmt. Während der Phage mit einer Sedimentationskonstanten s_o = 8o sedimentiert, lagen die s_o-Werte der Spaltprodukte zwischen s_o = 3 und s_o = 55. Die s_o-Werte der Spaltprodukte stimmten unter gleichen Versuchsbedingungen bei verschiedenen Phagenpräparationen nicht immer genau überein, trotzdem lassen sich folgende drei Aussagen machen :

1) Bei allen Präparationen, die drei Stunden bei 2o°C gegen einen o,o4 m Glycin/NaOH-Puffer pH 11,5 + o,1 % Mercaptoaethanol dialysiert wurden, traten nur Spaltprodukte mit einem s_o-Wert kleiner als 3 auf. Setzte man diesem Puffer o,3 m oder o,8 m Natriumchlorid zu, traten Produkte mit höheren s_o-Werten auf.
2) Oberhalb von pH 11,7 liegen trotz hoher Ionenstärke (o,8 m NaCl) die auftretenden s_o-Werte unter 3.

3) Zwischen pH 1o,3 und pH 11,5 werden die Phagen in Abhängigkeit von der Ionenstärke überwiegend zu leeren Proteinhüllen abgebaut.

Aus den Versuchen folgt, daß die Phagen durch Dialyse gegen o,o4 m Glycin/NaOH-Puffer pH 11,5 gespalten werden können. Da durch Adsorption an Dialyseschläuche hohe Verluste des A-Proteins auftreten, muß man o,1 % SDS oder o,o1 % Triton X 1oo zu dem Alkalipuffer geben, um die Spaltprodukte in der Gelelektrophorese analysieren zu können. Wie Abb. 2 zeigt, erfolgt bei pH 11,5 auf einem Gel, das 5 % Acrylamid enthält, eine Trennung beider Proteine. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine, besonders aber die des A-Proteins, ist unter diesen Bedingungen gering. Man kann bei diesem pH-Wert zwar die Proteine trennen, aber für eine Isolierung des A-Proteins müssen die Bedingungen noch geändert werden. Deshalb wurde versucht, bei pH 11,5 das Hüllprotein abzutrennen und dann, nach einem pH-Wechsel des Elektrodenpuffers auf pH 7,2 oder pH 8,o , das A-Protein aus dem Gel zu entfernen. Bei Voruntersuchungen wurden zwischen pH 7,2 und pH 8 die besten Trennungen erzielt. Diese Versuche scheiterten, da einmal der große pH-Sprung die physikalischen Eigenschaften des Geles geändert hatte (die Gele quollen sehr stark), und zum anderen das A-Protein nicht mehr als schmale Bande wanderte, sondern eine starke Bandenverbreiterung auftrat.

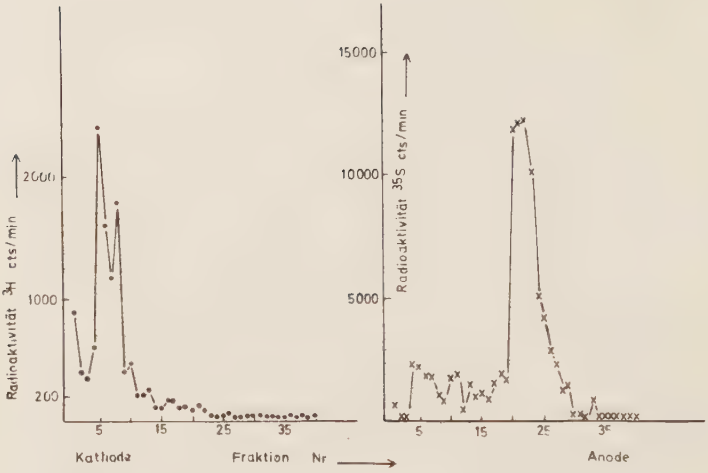


Abb. 2 :

Acrylamidgelelektrophorese von 3H-Histidin- und 35S-markierten Phagenproteinen bei pH 11,5.
Dauer der Elektrophorese : 1o Std. bei 3o mA/cm^2.
Elektrodenpuffer : o,o4 m Glycin/NaOH pH 11,5 ,
o,1 m NaCl, o,1 % SDS.
A-Protein 3H-Histidin-markiert (●——●);
Hüllprotein 35S-markiert (x——x).

Will man die Elektrophorese bei einem pH-Wert von 7,2 durchführen, muß man nach der Alkalispaltung und vor der Elektrophorese gegen den entsprechenden Puffer dialysieren.

Folgende Puffer wurden ausprobiert :

1) o,o1 m Phosphatpuffer pH 7,2 , o,1 % Mercaptoaethanol.

2) o,o1 m Phosphatpuffer pH 7,2 , Triton X1oo o,1 %, o,1 % Mercaptoaethanol.

3) o,o1 m Phosphatpuffer pH 7,2 , SDS o,1 %, o,1 % Mercaptoaethanol.

4) o,o1 m Phosphatpuffer pH 7,2 , SOS o,1 %, o,1 % Mercaptoaethanol.

Die Dialyse dauerte bei dreimaligem Pufferwechsel jeweils 2o Stunden (bei 2o°C). Die Proben in den verschiedenen Puffern wurden durch Elektrophorese in 7,5%igem Acrylamidgel analysiert. Unter den angegebenen Bedingungen liegen A-Protein und Hüllprotein nur in SDS-haltigem Phosphatpuffer in monomerem Zustand vor; die Proteine lassen sich daher auf dem Gel gut trennen (Abb. 3). Dagegen aggregierten die Proteine in den Puffern mit SOS Triton X1oo und ohne Detergens, so dass die Aggregate wegen ihrer Größe nicht mehr in das Gel einwandern konnten. Man kann daraus schließen, dass die Aggregate ein Molekulargewicht über 1oo ooo besaßen. Um die Spaltung eventuell noch zu vereinfachen, waren die Phagen ohne vorhergehende Alkalispaltung nur gegen SDS-haltigen (1%) Phosphatpuffer dialysiert worden. Bei der anschließenden Gelelektrophorese erhält man dann keine einheitlichen Spaltprodukte, sondern A-Protein und Hüllprotein treten in Aggregaten verschiedener Größe auf.

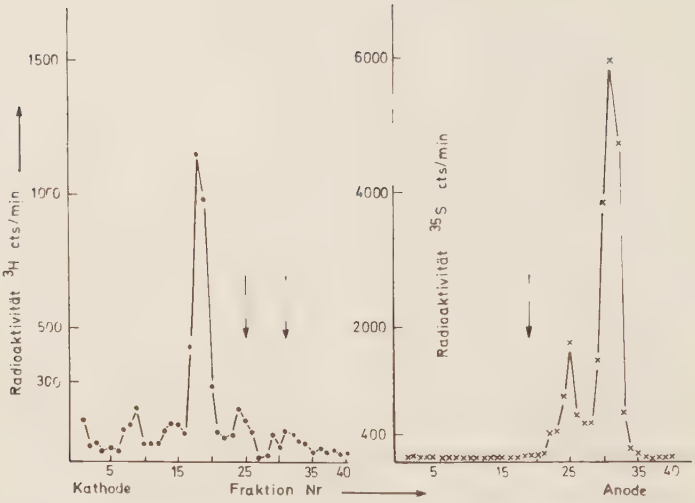


Abb. 3 :

Acrylamidgelelektrophorese von 3H-Histidin- und 35S-markierten Phagenproteinen bei pH 7,2.

Die Phagen wurden durch Dialyse gegen o,o4 m Glycin/NaOH pH 11,5 , o,1 % SDS und o,o1 m Phosphatpuffer pH 7,2, o,1 % SDS gespalten.
Dauer der Elektrophorese : 5 Std. bei 3o mA/cm^2.
Elektrodenpuffer : o,1 m Phosphat pH 7,2 , o,1 % SDS.
A-Protein 3H-Histidin-markiert (●——●);
Hüllprotein 35S-markiert (x——x).
Die kleine 2. 35S-haltige Komponente besteht aus dimerem Hüllprotein. Die Pfeile markieren die Position des Hüllproteins bzw. des A-Proteins.

Auf Grund der beschriebenen Versuchsergebnisse wurden für eine präparative Isolierung des A-Proteins folgende Bedingungen gewählt :

Die Phagen werden durch Dialyse gegen o,o4 m Glycin/NaOH-Puffer pH 11,5 , o,1 % Mercaptoaethanol, o,1 % SDS und

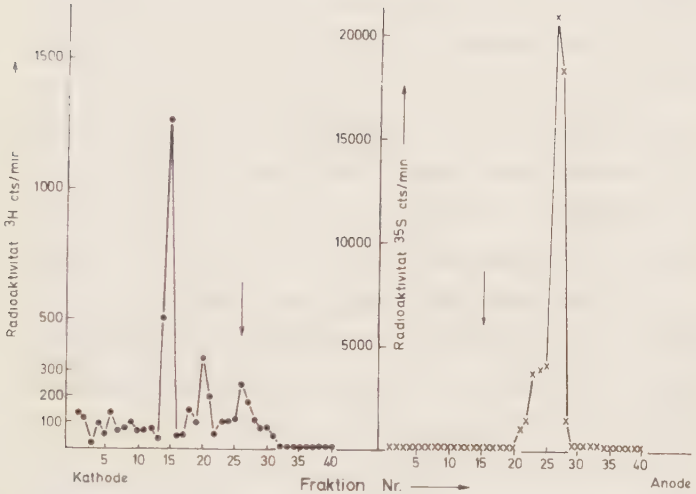


Abb. 4 :

Acrylamidgelelektrophorese von 3H-Histidin und 35S-markierten Phagenproteinen.
Spaltung der Phagen durch Dialyse gegen folgende Puffer :
1) 6,5 m Guanidin-HCl, o,o5 m Tris-HCl pH 8,5 ;
2) 9 m Harnstoff, o,o5 m Essigsäure, o,14 m Mercapto-aethanol;
3) 8,6 m Harnstoff, o,o1 m EDTA, o,14 m Mercapto-aethanol, o,1 m Tris-HCl pH 8,4;
4) o,o1 m Phosphat pH 7,2 , o,1 % SDS, o,1 m Mercapto-aethanol.
Dauer der Elektrophorese : 4,5 Std. bei 3o mA/cm^2.
Elektrodenpuffer : o,1 m Phosphat pH 7,2 , o,1 % SDS.
A-Protein 3H-Histidin-markiert (●——●);
Hüllprotein 35S-markiert (x——x).

o,o1 m Phosphatpuffer pH 7,2 , o,1 % Mercaptoaethanol, o,o1 % SDS gespalten. A-Protein und Hüllprotein, die in monomerer Form vorliegen, werden dann durch Elektrophorese auf 7,5%igem Acrylamidgel getrennt, bzw. das

A-Protein isoliert. Nukleinsäurebruchstücke stören die Trennung nicht, da unter den angegebenen Bedingungen Nukleinsäure im Gegensatz zu den Proteinen zur Kathode läuft.

Die beschriebene Methode der Spaltung der Phagen in seine Einzelkomponenten bedeutet eine Vereinfachung gegenüber der bisher angewandten Methode, den Phagen durch langwierige abwechselnde Dialyse gegen Puffer, die Guanidin, Harnstoff, oder SDS enthalten, zu spalten (34). Vergleicht man die Ergebnisse von Elektrophoresen auf 7,5%igem Acrylamidgel, denen eine Alkalispaltung bzw. eine Spaltung in Guanidin usw. vorausging, findet man eine gute Übereinstimmung (Abb. 3, 4).

4. Molekulargewichtsbestimmung des A-Proteins

Wie bereits erwähnt (siehe II./3.), kann die Acrylamidgelelektrophorese zur Bestimmung der Molekulargewichte von Proteinen im Bereich zwischen 15 ooo und 1oo ooo herangezogen werden. Diese Methode erlaubt Bestimmungen mit µg-Mengen.

Sie wird in folgender Weise durchgeführt :

Mit Proteinen bekannter Größe als Standardwerte wird eine Eichkurve aufgestellt. Dazu werden die Wanderungsstrecken der Standardproteine und eines Farbstoffes gemessen. Der Farbstoff (Bromphenolblau) wandert in dem System am schnellsten und markiert die Pufferfront. Die

Wanderungsstrecke des Farbstoffes wird als Einheitsgröße angesetzt. Auf der Abszisse werden die Quotienten aus Wanderungsstrecke Protein zu Wanderungsstrecke Farbstoff aufgetragen, während auf der im logarithmischen Maßstab eingeteilten Ordinate die Molekulargewichte der dazugehörenden Proteine eingesetzt werden. Durch die Schnittpunkte der Lote über den entsprechenden Werten auf Abszisse und Ordinate legt man eine Gerade. Diese Gerade ist die "Eichkurve". Nun bestimmt man den Quotienten aus Wanderungsstrecke des unbekannten Proteins zu Wanderungsstrecke des Farbstoffes. Das Lot über diesem Wert schneidet die Eichkurve. Der Schnittpunkt zeigt das Molekulargewicht des gesuchten Proteins an.

Zur Bestimmung des Molekulargewichtes des A-Proteins wird der Phage gespalten, wie in Kapitel II./3. beschrieben. Der Quotient der Wanderungsstrecken aus A-Protein und Farbstoff lag bei drei Bestimmungen zwischen o,54 und o,55. Das ergibt ein Molekulargewicht zwischen 41 ooo und 42 ooo für das A-Protein (Abb. 5).

Um die Genauigkeit der Methode zu überprüfen, wurden Proteine mit bekanntem Molekulargewicht auf diese Weise nachbestimmt. Für Pepsin wurde dabei in zwei Untersuchungen ein Molekulargewicht von 34 ooo bzw. 35 5oo ermittelt. In der Literatur wird ein Wert von 34 5oo für Pepsin an-

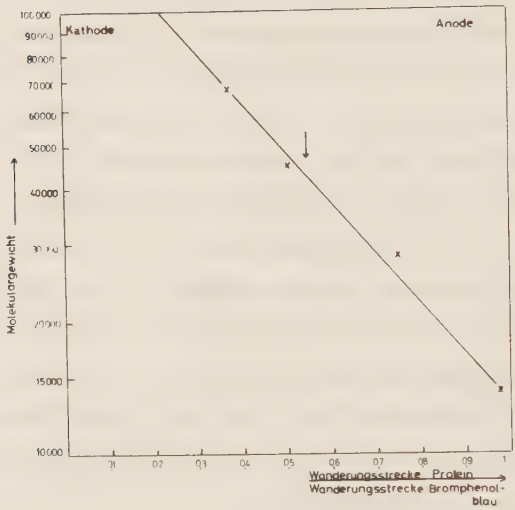


Abb. 5 :

Molekulargewichtsbestimmung des A-Proteins durch Elektrophorese in Acrylamidgel.
Mit folgenden Proteinen als Standardwerten wurden die Eichkurven aufgestellt :
1) fr-Hüllprotein Mol.-Gew. 13 750.
2) fr-Hüllprotein (dimer) Mol.-Gew. 27 500.
3) Albumin aus Hühnerei Mol.-Gew. 45 000 (36).
4) Rinderserumalbumin Mol.-Gew. 66 500 (36).
Der Pfeil zeigt die Position des A-Proteins.
Dauer der Elektrophorese : 6 Stunden bei 3o mA/cm^2.
Elektrodenpuffer : o,1 m Phosphat pH 7,2 , o,1 % SDS.

gegeben (35). Die Abweichung der gefundenen Werte gegenüber dem Literaturwert beträgt weniger als 3%. Die Reproduzierbarkeit der Methode ist sehr gut. Wenn man analog zur Pepsinbestimmung bei dem ermittelten Molekulargewicht des A-Proteins eine Fehlergrenze von $\pm$ 3% ansetzt, kann man für das A-Protein einen Wert zwischen 4o ooo und

43 ooo annehmen. Bezogen auf das Gesamtgewicht des Phagen (4×10^6) beträgt dann der Anteil des A-Proteins etwa 1 %.

5. Präparative Isolierung des A-Proteins

Methodisch gibt es zwischen der analytischen Trennung und der präparativen Isolierung neben einigen kleineren Änderungen nur einen wichtigen Unterschied. Bei den analytischen Verfahren werden die Proteine im Gel getrennt, fixiert und dann die Gele gefärbt, bzw. in gleiche Teile geschnitten und die Radioaktivität jedes einzelnen Scheibchens bestimmt. Die Proteine dürfen hier also nicht aus dem Gel wandern. Im Gegensatz dazu müssen bei der präparativen Isolierung die Proteine aus dem Gel eluiert werden (37). Am unteren Ende der Gelsäule fließt kontinuierlich ein Puffer, der die austretenden Proteine sammelt. Die Bandbreite und die Trennschärfe werden dabei von der Fließgeschwindigkeit des Puffers mitbestimmt (Abb. 6). Die kleinen Änderungen betreffen die Kühlung des Geles und den Stromfluß während der Elektrophorese (siehe MATERIAL und METHODE). Ansonsten wurden die gleichen Bedingungen gewählt, die auch bei der analytischen Trennung angewendet wurden.

In zwei präparativen Läufen wurden jeweils 8o mg fr-Phagen und eine bestimmte Menge ^{3}H-Histidin- und ^{35}S-

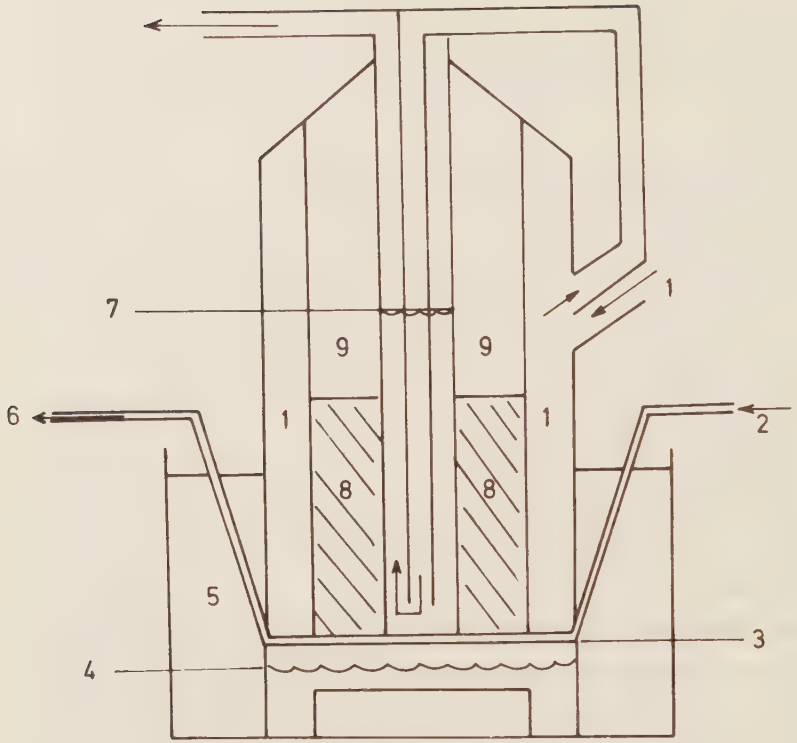


Abb. 6 :

Schematischer Aufbau der Apparatur für die präparative Gelelektrophorese.
1 = Wasserkühlung; 2 = Zulauf des Elutionspuffers; 3 = Membran (undurchlässig für Makromoleküle); 4 und 7 = Elektroden; 5 = Pufferbehälter; 6 = Ablauf zum Fraktionssammler; 8 = Acrylamidgel; 9 = Pufferkammer.

markierter Phagen nach der Spaltung in die Einzelkomponenten der Elektrophorese unterworfen. Die Fraktionen mit dem günstigsten ^{3}H / ^{35}S-Verhältnis (Abb. 7) wurden durch Dialyse gegen eine 25%ige Polyaethylenglykollösung eingeengt.

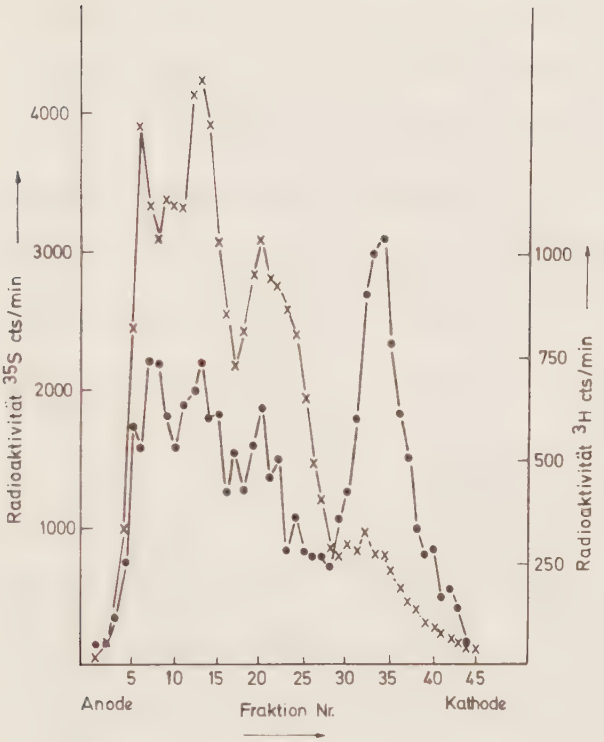


Abb. 7 :

1. Lauf einer präparativen Acrylamidgelelektrophorese. Länge der Gelsäule : 8 cm; Dauer der Elektrophorese : 15 Std. bei 2o mA/cm^2; Elektrodenpuffer : o,1 m Phosphatpuffer pH 7,2 , o,1 % SDS;
3H-Histidin-markiertes Protein (●——●);
35S-markiertes Protein (x——x).
Die Fraktionen Nr. 32-38 wurden gesammelt und eingeengt.

Da nach einem Lauf das A-Protein zwar stark angereichert war, aber immer noch Hüllprotein enthielt, wurden die eingeengten Fraktionen beider Läufe noch einmal über

eine um die Hälfte verkürzte Gelsäule getrennt, und die entsprechenden Fraktionen wieder eingeengt (Abb.8). Die Ausbeute an ^{3}H-Radioaktivität ergab nach dem 1. Lauf 3o % und nach dem 2. Lauf 5o %, bezogen auf gesamte eingesetzte ^{3}H-Radioaktivität sind das 15 % Ausbeute. Bei UV-Absorptionsmessungen betrug das Verhältnis des Extinktionskoeffizienten 26o mμ/28o mμ o,78.

Die Reinheit des isolierten A-Proteins wurde durch eine abschließende analytische Gelelektrophorese geprüft. Die Analyse ergab, dass das A-Protein weitgehend von Hüllprotein gereinigt war (Abb. 9).

Die Isolierung des A-Proteins bildet eine wesentliche Voraussetzung für die Rekonstitution von infektiösen fr-Phagen in vitro und für das Studium der Virusbildung überhaupt. Bisher gibt es keine experimentell begründete Vorstellung wie aus den Einzelkomponenten RNS, Hüllprotein und A-Protein das infektiöse Virus entsteht. Um diesen Vorgang experimentell in den Griff zu bekommen wird er in zwei Phasen aufgeteilt :

1) Bildung der Proteinhülle;

2) Rekonstitution von infektiösen Phagen unter Berücksichtigung möglicher Vorstufen wie RNS-Hüllproteinkomplex, RNS-A-Proteinkomplex oder leerer Hüllen.

In dem folgenden Kapitel wird untersucht, welche Rolle das A-Protein bei diesen zwei Phasen spielt.

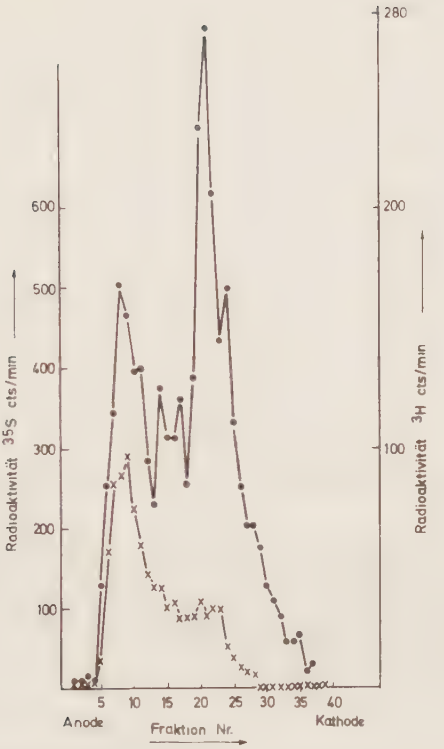


Abb. 8 :

2. Lauf einer präparativen Acrylamidgelelektrophorese.
Länge der Gelsäule : 4 cm; Dauer der Elektrophorese :
1o Std. bei 2o mA/cm^2; Elektrodenpuffer : o,1 m Phosphat-
puffer pH 7,2 , o,1 % SDS.
3H-Histidin-markiertes Protein (●——●);
35S-markiertes Protein (x——x).
Die Fraktionen Nr. 19-25 enthalten das A-Protein.

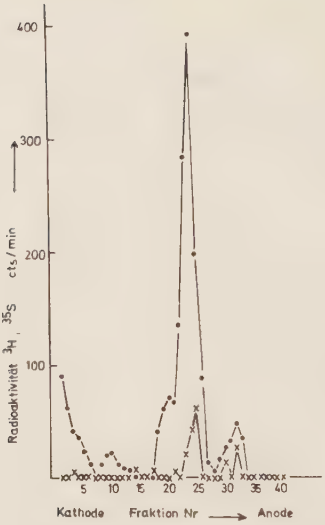


Abb. 9 :

Analytische Acrylamidgelelektrophorese des gereinigten A-Proteins bei pH 7,2.
Dauer der Elektrophorese : 5,5 Std. bei 3o mA/cm^2;
Elektrodenpuffer : o,1 m Phosphatpuffer pH 7,2 , o,1 % SDS.- 3H-Histidin-markiertes Protein (●——●);
35S-markiertes Protein (x——x).

III. Rolle des A-Proteins bei der Virusbildung

1. Rolle des A-Proteins bei der Reaggregation leerer Proteinhüllen

Nukleinsäurefreie, leere Proteinhüllen von kubischen Eikosaederviren sind mehrmals in der Literatur beschrieben worden. Sie fallen entweder bei der Virusaufarbeitung als Nebenkomponente an oder können aus vollständigen Viren durch Alkalibehandlung (38) oder osmotischen

Schock und mehrmaliges Tauen und Einfrieren (24) erhalten werden. Proteinhüllen, welche auf diese Weise entstanden sind, lassen keine Aussage zu, ob diese allein aus den Hüllproteinuntereinheiten entstehen können. Bei allen Versuchen, die Reaggregation leerer Hüllen von kubischen Viren in vitro nachzuvollziehen, wurden bisher Nukleinsäure oder Polynukleotide benötigt (24, 39). In den folgenden Abschnitten wird beschrieben, unter welchen Bedingungen es gelungen ist, leere Hüllen aus monomeren Hüllproteinuntereinheiten zu reaggregieren.

a) Essigsäurespaltung des Phagen und Reinigung des Hüllproteins

Die Proteinhülle des Phagen besteht vorwiegend aus Hüllprotein. Die Einschränkung "vorwiegend" erfolgt, da nicht geklärt ist, ob das A-Protein in der Hülle oder im Inneren des Phagen eingebaut ist. Es scheint daher sinnvoll, zunächst die Reaggregation der Proteinhülle mit gereinigtem Hüllprotein als Ausgangsmaterial zu versuchen und erst bei negativen Ergebnissen die Experimente mit isoliertem A-Protein und Hüllprotein zusammen zu wiederholen. HOHN hatte postuliert, dass RNS bei der Bildung der Hülle essentiell ist (24); deshalb mußte das Ausgangsmaterial für unsere Versuche zur Hüllenbildung möglichst RNS-frei sein. Um den RNS- und A-Protein-Gehalt des gereinigten Hüllproteins bestimmen zu können, wurden dem Ansatz Pha-

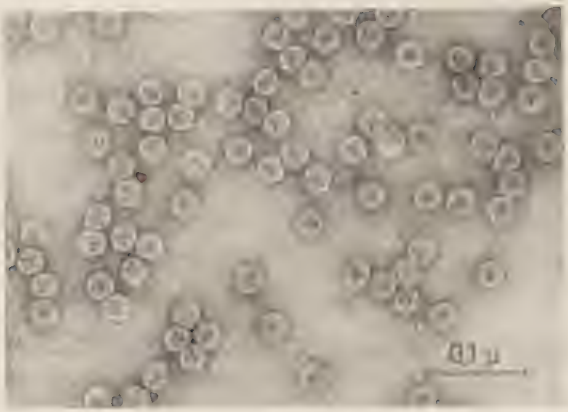
gen beigemischt, deren RNS ^{32}P- und A-Protein ^{3}H-Histidin-markiert waren. Die Phagen wurden nach der Essigsäuremethode von FRAENKEL-CONRAT (4o) gespalten. Diese Methode erleichtert gegenüber einer Alkalispaltung (siehe II./3.) die Abtrennung der Nukleinsäure; denn während das Protein in 66%iger Essigsäure in Lösung bleibt, fällt die RNS als flockiger Niederschlag aus und kann durch zweimalige Zentrifugation weitgehend entfernt werden. Die Proteinfraktion enthielt dann etwa noch 5% der ursprünglich vorhandenen Nukleinsäure. Nach einer Säulenchromatographie über Sephadex G5o oder Biogel P3o in 3o%iger Essigsäure war der RNS-Gehalt des Proteins kleiner als o,o4 %. Daraus kann man errechnen, wieviel RNS-Moleküle das gereinigte Protein noch enthält : 1 ooo µg Hüllprotein (2,4 x $1o^{14}$ Hüllen) enthalten vor der Spaltung des Phagen 43o µg RNS (2,4 x $1o^{14}$ Moleküle). Nach der Reinigung enthält die gleiche Menge Protein nur noch o,37 µg RNS (2 x $1o^{11}$ Moleküle RNS). Auf 18o Hüllproteinmoleküle, die einer vollständigen Proteinhülle des Phagen entsprechen, entfallen demnach 3 - 4 Nukleotide. Das Verhältnis der Extinktionskoeffizienten 26o mµ/28o mµ bei UV-Absorptionsmessungen betrug bei diesem gereinigten Protein o,59. Bei weiteren Versuchen wurde immer das Verhältnis E(26o) / E(28o) als Maß für die Reinheit des Hüllproteins gewertet. Proteinpräparationen mit einem Quotienten kleiner als o,61 galten als "RNS-frei".

Wie Versuche mit ^{3}H-Histidin-markierten Phagen zeigen, geht das A-Protein während der Reinigung des Hüllproteins fast vollständig verloren. Nach der Essigsäurespaltung und der ersten Zentrifugation bleibt es noch mit dem Hüllprotein zusammen im Überstand. Doch während der zweiten Reinigung treten hohe Verluste an Radioaktivität auf. "RNS-freies" Hüllprotein enthielt weniger als 1o% der ursprünglich vorhandenen ^{3}H-Radioaktivität.

In der analytischen Ultrazentrifuge wurde das Molekulargewicht des Hüllproteins in 66%iger Essigsäure mittels Sedimentationsmessung bestimmt (41). Die Messung ergab 16 ooo, ein Molekulargewicht, das gut mit dem chemisch ermittelten von 13 75o übereinstimmt. Das Ausgangsmaterial für die Hüllenbildung lag also in monomerer Form vor. Bei Kontrolluntersuchungen des Hüllproteins in 3o%iger Essigsäure im Elektronenmikroskop wurden keine Phagen oder Phagen-ähnliche Partikel mehr nachgewiesen.

b) Bildung der künstlichen leeren Proteinhüllen

Das Hüllprotein liegt in 3o%iger Essigsäure in denaturierter Form vor (42). Die Renaturierung des Proteins, als Voraussetzung für eine Reaggregation, wird durch Dialyse gegen Wasser eingeleitet. Das Außendialysat wurde gewechselt, bis der Geruch von Essigsäure nicht mehr wahrzunehmen war. Bei hoher Konzentration (über 1 mg/ml) fiel



a)

b)

Abb. 1o :

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von intakten fr-Phagen und reaggregierten Proteinhüllen.
a) fr-Phagen; b) reaggregierte Proteinhüllen.

das Protein dabei häufig aus. Immerhin blieben in o,oo5%iger Essigsäure noch 1 mg/ml Protein gelöst (43). Die gegebenenfalls trübe Lösung wurde mit o,o2 m NaOH auf einen pH-Wert zwischen pH 7 und pH 8 eingestellt; das ausgefallene Protein löste sich dadurch. Bei der anschließenden Dialyse gegen o,o2 Phosphatpuffer pH 7,6 , o,15 m NaCl trat eine starke Opaleszenz auf. Proben der opaleszierenden Lösung zeigen im Elektronenmikroskop einen hohen Anteil runder fr-Phagen-ähnlicher Partikel, die als Hohlkugeln erscheinen, wenn das Kontrastmittel in ihr Inneres einzudringen vermochte (Abb. 1o b). Die Opaleszenz wurde also durch die Polymerisation der Untereinheiten zu größeren Aggregaten und Hüllen verursacht. Nach Dialyse von 5 - 6 Stunden gegen Phosphatpuffer war die Bildung der Hüllen abgeschlossen (siehe III./1d). Wurden die Hüllen längere Zeit darüberhinaus dialysiert (z.B. 2o Stunden), flockten sie besonders bei Konzentrationen über 1 mg/ml häufig aus. Wie im Elektronenmikroskop nachgewiesen werden konnte, handelte es sich um Aggregate von Hüllen. Die Neigung,Aggregate zu bilden, zeigen Phagen auch in Konzentrationen von 4o mg/ml nicht. Die leeren Proteinhüllen und die Phagen unterscheiden sich im Elektronenmikroskop nicht. Bei Standardbedingungen, d.h. Hüllenbildung bei pH 7,6 bildeten sich Hüllen einheitlicher Größe. Ihr Durchmesser entsprach mit 26o Å, im Rahmen der Meßgenauigkeit, dem der Phagen. Bei keiner

Präparation wurden Hüllen gefunden mit einem signifikant größeren oder kleineren Durchmesser, z.B. Hüllen mit 16o Å Durchmesser. Desgleichen wurden nie stäbchenförmige Produkte beobachtet. Die Oberflächenstrukturen zeigten soweit erkennbar ebenfalls keine Unterschiede.

c) Charakterisierung der Proteinhüllen durch Sedimentationsverhalten

In der analytischen Ultrazentrifuge sedimentieren die künstlichen Hüllen mit s_o = 68 (Abb. 11), der intakte Phage mit s_o = 8o; Hüllen dagegen, die durch Alkalibehandlung oder osmotischen Schock usw. aus ganzen Phagen entstanden sind, mit s_o = 54. Die Ursache der Differenz der s_o-Werte bei den Hüllen ist noch nicht geklärt. Möglicherweise ist die Struktur der rekonstituierten Hüllen kompakter, da ja die anderen Hüllen eine Öffnung haben müssen, durch welche die RNS oder RNS-Teile austreten können, bzw. RNase in die Hüllen einzudringen vermag.

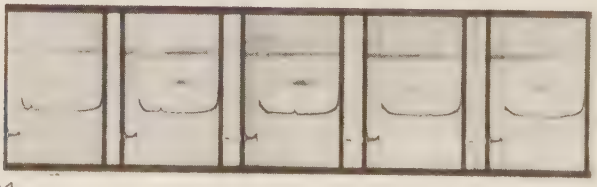


Abb. 11 :
Sedimentationsverhalten der künstlichen leeren Hüllen. Die Probe (in o,o2 m Phosphatpuffer, o,1 m NaCl) wurde in der analytischen Zentrifuge bei 42 2oo Upm zentrifugiert. Die Aufnahmen wurden in Abständen von 8 Min. gemacht.

Im CsCl-Dichtegradienten banden Phagen und Hüllen erwartungsgemäß bei verschiedenen Dichten, die Phagen bei der Dichte 1,43 g/ml und die künstlichen leeren Hüllen ohne die RNS bei 1,3o g/ml (Abb. 12).

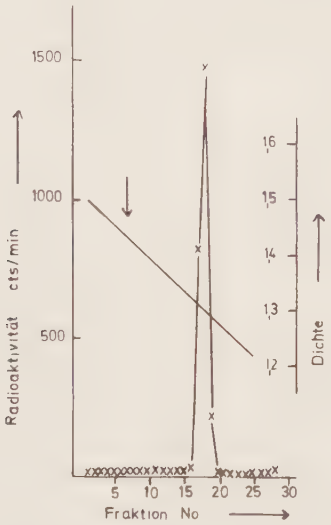


Abb. 12 :
CsCl-Dichtegradientenzentrifugation von fr-Phagen und künstlichen leeren Hüllen.
Die mittlere Dichte der CsCl-Lösung beträgt 1,3o g/ml.
Dauer der Zentrifugation : 22 Std. bei 34 ooo Upm im SW39-Rotor der Spinco-Ultrazentrifuge.
35S-markierte leere Hüllen (x——x). Der Pfeil zeigt die Position der Phagen.

Im Rohrzuckergradienten sind die Unterschiede ebenfalls deutlich. Für eine rasche Bestimmung des zu Hüllen umgebildeten Proteins eignet sich dieser Gradiententyp besonders. Das in Essigsäure und o,o2 n NaOH gelöste Pro-

tein sedimentiert bei den gewählten Bedingungen nicht (siehe MATERIAL und METHODEN), während die gebildeten Hüllen in dem Gradienten sedimentieren (Abb. 13).

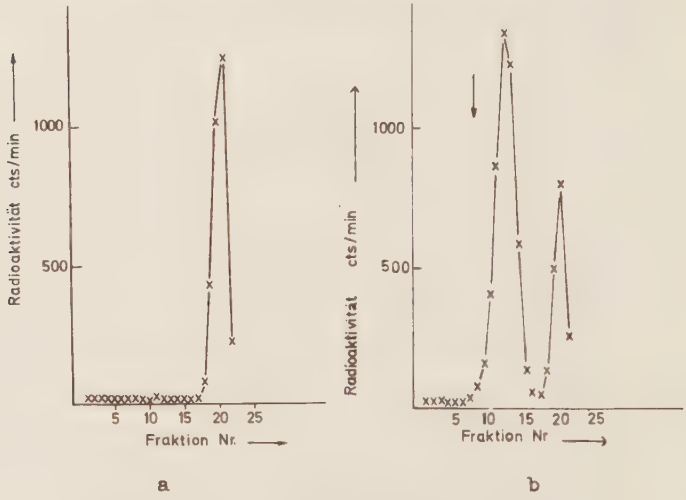


Abb.13 :

Sedimentation von monomerem Hüllprotein, künstlichen leeren Hüllen und fr-Phagen im Rohrzuckergradienten. Dauer der Zentrifugation : 7o Min. bei 4o ooo Upm.
a) 35S-markiertes Hüllprotein (x——x);
b) 35S-markierte leere Hüllen (x——x) und fr-Phagen (Pfeil).

d) Abhängigkeit der Hüllenbildung von Proteinkonzentration, pH-Wert, Temperatur, Ionenstärke und Zeit

Abhängigkeit von der Proteinkonzentration :

Es wurde eine starke Abhängigkeit von der Proteinkonzentration der Ausgangslösung bei der Umsetzung zu leeren Hüllen beobachtet (Tab. 1).

Konzentration der Ausgangslösung :	% Protein, das in Hüllen umgewandelt wurde :
1 3oo µg/ml	89 %
4oo µg/ml	6o %
2oo µg/ml	3o %
1oo µg/ml	8 %

Tab. 1 :
Abhängigkeit der Hüllenbildung von der Proteinkonzentration.
Puffer : o,o2 m Natriumphosphat pH 7,6 , o,15 m NaCl; Dialyse: 2o Std. bei 4° C. Reinigung und Bestimmung der Bildungsrate der Hüllen erfolgten im Rohrzuckergradienten (siehe MATERIAL und METHODEN).

Auch unterhalb einer Proteinkonzentration von 1oo µg/ml können sich noch Hüllen bilden. In jedem Fall reproduzierbar erhält man jedoch Hüllen bei einer Mindestkonzentration von 1oo µg/ml . Die gebildeten künstlichen Hüllen sind relativ stabil. Man kann sie durch einfaches Verdünnen auf Proteinkonzentrationen, die unterhalb des kritischen Wertes (1oo µg/ml) für die Hüllenbildung liegen, nicht zum Dissoziieren bringen.

Da bei Reaggregationsexperimenten mit 1 - 2 mg Protein/ml 8o - 9o % des eingesetzten Proteins zu Hüllen umgewandelt werden, ist es interessant, die Proteinkonzentration in einer E. coli-Zelle zu errechnen. Nimmt man als Abmessung für eine mittelgroße Zelle 2o ooo x 8 ooo Å (44), und setzt ihren Querschnitt als rund voraus, dann entsprechen $1o^{12}$ Bakterien einem cm^3. Bei einer Synthese von $1o^3$ Phagen pro Bakterium ergibt sich eine Hüllproteinkonzentration von 4,2 mg/ml in der Zelle (45). Da z.B. Zellbestandteile den Raum verringern, der dem Protein zur Verfügung stehen könnte, liegen am Syntheseort wahrscheinlich noch höhere Konzentrationen vor, so daß die errechnete Konzentration als untere Grenze angesehen werden kann. Mit einer Proteinkonzentration von 2 mg/ml erreicht man also bei weitem nicht die Konzentration in der Zelle. Es ist also durchaus möglich, daß bei der Phagenvermehrung in E. coli neben den RNS-haltigen Phagen leere Hüllen entstehen. Die Virushüllen, welche normalerweise bei den Viruspräparationen gefunden werden, müssen also nicht notwendigerweise als Viren mit defekten Hüllen, deren RNS durch RNase zerstört worden ist, angesehen werden.

Abhängigkeit von dem pH-Wert :

Die Hüllenbildung ist stark pH-abhängig. Mit zunehmendem alkalischem pH-Wert verschlechtert sich die Hüllenbildung. Oberhalb pH 1o,5 erfolgt keine Hüllenbildung

mehr. Die Abnahme positiver Ladungen im Protein verhindert offensichtlich die Hüllenbildung (Tab. 2).

Puffer	% Hüllenbildung	Dauer der Dialyse
o,o2 m Phosphatpuffer pH 4,5 o,15 m NaCl	85 %	5^h bei 4^oC
o,o2 m Phosphatpuffer pH 6,o o,15 m NaCl	63 %	5^h bei 4^oC
o,o2 m Phosphatpuffer pH 7,6 o,15 m NaCl	7o %	5^h bei 4^oC
o,o2 m Phosphatpuffer pH 9,o o,15 m NaCl	15 %	5^h bei 4^oC
o,o2 m Phosphatpuffer pH 1o,5 o,15 m NaCl	9 %	5^h bei 4^oC

Tab. 2 :
Abhängigkeit der Hüllenbildung vom pH-Wert.
Proteinkonzentration : 1,6 mg/ml.

Bei niederen pH-Werten wird häufig die Bildung sogenannter Multischalen beobachtet, bei denen mehrere Schichten von Protein über eine Hülle gelagert sind (46). Diese Schichten bilden jedoch keine geschlossenen Hüllen mehr.

Abhängigkeit von der Temperatur :

Während man bei Temperaturen um 4^oC und o,o2 m Phosphatpuffern pH 7,6 mit und ohne NaCl-Zusatz auf jeden Fall leere Hüllen erhält, bilden sich bei Erhöhung der Temperatur auf $2o^oC$ bzw. 37^oC unter sonst gleichen Bedingungen keine Hüllen mehr. Das Protein flockt häufig nach

einigen Minuten aus, im Rohrzuckergradienten tritt an der üblichen Stelle keine Bande auf. Diese Art von Temperaturabhängigkeit überrascht. Nachdem die Phagen bei 37°C gezüchtet werden, müßte man erwarten, daß auch die Hüllenbildung in vitro bei dieser Temperatur ohne weiteres erfolgt. Das Ergebnis kann nur durch das unterschiedliche Milieu in der Zelle und im Reagenzglas erklärt werden. Auf die starke Pufferabhängigkeit bei derartigen Polymerisationen haben auch andere Autoren hingewiesen (47).

Abhängigkeit von der Ionenstärke und Zeit :

Die Geschwindigkeit der Hüllenbildung und der Prozentsatz der gebildeten Hüllen hängen stark von der Ionenkonzentration ab.

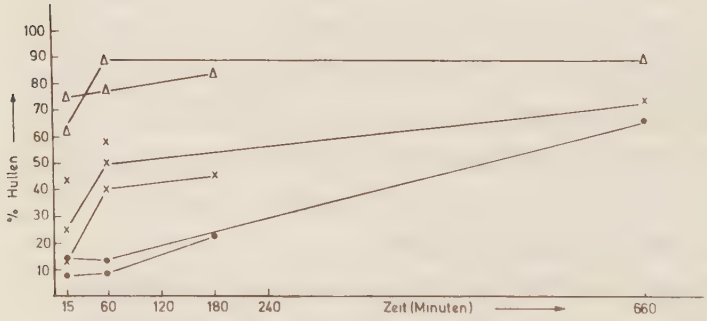


Abb. 14 :

Abhängigkeit der Hüllenbildung von Zeit und Ionenstärke. Proteinkonzentration der Ausgangslösung : 1,5 mg/ml. Bei 4°C wurde gegen folgende Puffer dialysiert : 1) o,o2 m Phosphatpuffer pH 7,6 (●—●); 2) o,o2 m Phosphatpuffer pH 7,6 , o,15 m NaCl (x—x); 3) o,o2 m Phosphatpuffer pH 7,6 , o,7 m NaCl (▲—▲). Die Bestimmung des Prozentsatzes an Protein, der zu Hüllen umgewandelt wurde (% Hüllen), erfolgte im Rohrzuckergradienten.

Bei Dialyse gegen Puffer hoher Ionenstärke (o,7 m NaCl) werden 9o % des Proteins zur Hüllenbildung innerhalb von 6o Minuten verbraucht. Werden Puffer mit niederer Ionenkonzentration (o,o2 m Phosphat) verwendet, sind nach 11-stündiger Dialyse erst 5o % des Proteins in Hüllen umgewandelt (Abb. 14).

e) Elektrophoretisches Verhalten der Proteinhüllen

Durch Elektrophorese auf Acetatfolie wurde die Beweglichkeit der Phagen und der künstlichen leeren Hüllen im elektrischen Feld verglichen. Die Wanderungsgeschwindigkeit wurde bei den pH-Werten pH 5,5 , pH 8,o und pH 1o,5 bestimmt. Im Falle von Ladungsunterschieden sollte eine Trennung möglich sein. Da bei keinem der pH-Werte eine unterschiedliche Beweglichkeit auftrat, scheinen die Nettoladungen von ganzen Phagen und leeren Hüllen gleich zu sein. Dieses Ergebnis sagt weniger über die Hüllen aus als vielmehr über die Phagen. Die RNS muß innerhalb des Phagens so angeordnet sein, dass sie mit der Proteinhülle keine Wechselwirkungen eingeht, welche die Nettoladung der geschlossenen Hülle beeinflussen. Wahrscheinlich liegt die RNS an der Innenseite der Schale. Die Resistenz des intakten Phagen gegen RNase unterstützt diese Folgerung (Abb. 15).

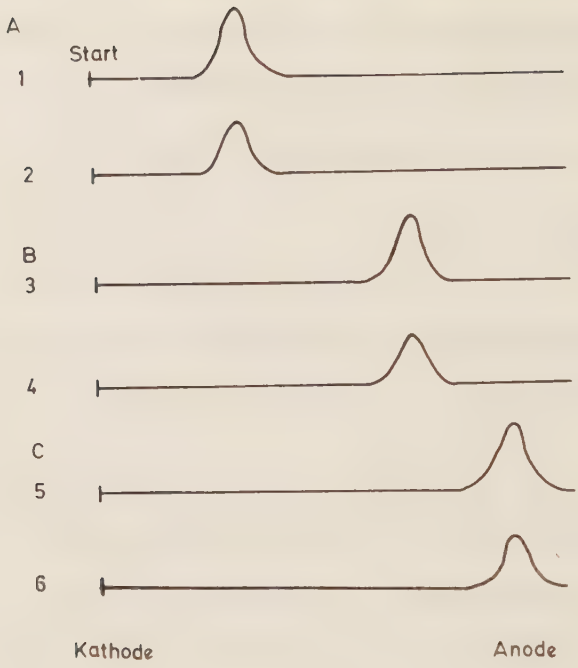


Abb. 15 :

Elektrophorese von künstlichen leeren Hüllen und Phagen auf Acetatfolie.
Dauer der Elektrophorese : 45 Min. bei 250 V.
A = 0,02 m Phosphatpuffer pH 5,5 , 0,03 m NaCl;
B = 0,02 m Phosphatpuffer pH 8,0 , 0,03 m NaCl;
C = 0,02 m Glycin/NaOH pH 10,5 , 0,03 m NaCl;
Leere Hüllen : 1,3,5; Phagen : 2,4,6.

f) Antigene Eigenschaften der künstlichen leeren Hüllen

Kreuzreaktionen von verschiedenen Proteinen als Antigene gegenüber demselben Antikörper können je nach ihrer Quantität als Maß für die Verwandtschaft dieser Proteine gewertet werden. Bei der Antigen-Antikörperreaktion

reagieren nur spezifische Bereiche der Moleküloberfläche des Antigenes mit ebenfalls spezifischen Bindungsstellen des Antikörpers. Das Oberflächenmuster eines Proteins wird durch dessen Sekundär- und Tertiärstruktur bestimmt; diese wiederum werden durch die Primärstruktur festgelegt. Da sich bei irreversibel denaturierten Proteinen bei gleichbleibender Primärstruktur Sekundär- und Tertiärstruktur geändert haben, erfolgt keine Reaktion mehr. Eine noch vorhandene Antigen-Antikörper-Reaktion kann daher als Maß für die Qualität der Renaturierung eines Proteins angesehen werden. Wenn also z.B. ein renaturiertes fr-Hüllprotein ebenso gut wie ein natives fr-Hüllprotein mit dem gleichen Antiserum reagiert, müssen deren beider Sekundär- und Tertiärstruktur entweder gleich sein oder weitgehend übereinstimmen. Antigen-Antikörper-Reaktionen sind äusserst empfindlich und sehr selektiv.

Die quantitative Übereinstimmung des Testes (Abb. 16B) bei den künstlichen leeren Hüllen und vollständigen Phagen läßt darauf schließen, daß die Struktur der Proteine der rekonstituierten Hüllen und die der Phagen weitgehend übereinstimmen.

Die Spezifität des Testes wurde durch Kontrollversuche mit Antiserum gegen menschliches Choriongonadotropin (HCG) überprüft. Bei der gleichen Menge Hüllen findet man mit dem Lowry-Test (48) in beiden Fällen, also mit und ohne

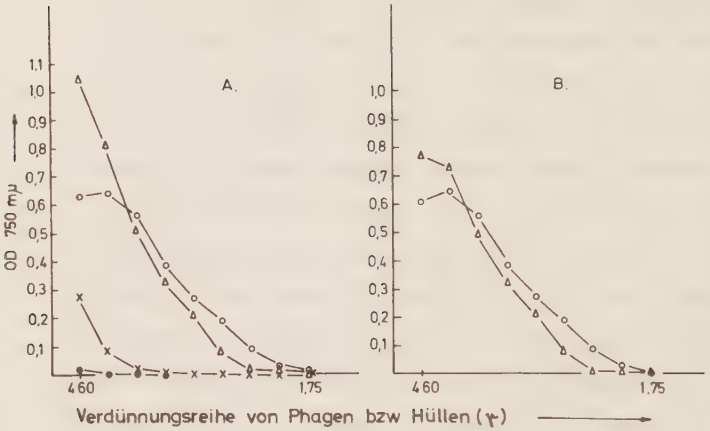


Abb. 16 :

Bestimmung der Antikörperbindungskapazität von fr-Phagen und künstlichen leeren Hüllen.
A) Leere Hüllen + fr-Antiserum (△——△); Phagen und fr-Antiserum (●——●); leere Hüllen mit und ohne HCG-Antiserum ergeben die gleichen Werte (x——x); Phagen (●——●).
B) Korrigierte Werte.

HCG-Antiserum, übereinstimmende Werte. Das beweist einmal die Spezifität des fr-Antiserums, zum anderen erklärt es den überhöhten Wert bei der Hüllen-fr-Antiserum-Praezipitation (Abb. 16A), da die Hüllen bei längerem Stehen (48^h bei 4^oC) teilweise aggregieren und dadurch praezipitieren. Der Test wird aber durch dieses Verhalten nicht beeinträchtigt, man muß lediglich eine Korrektur durchführen, indem die Kontrollwerte - Hüllen ohne Serum - von der eigentlichen Testreihe abgezogen werden (Abb. 16B).

Durch die Ergebnisse dieser Versuche wurde zum ersten Mal gezeigt, daß auch die Proteinhüllen von Eikosaederviren durch selbstgesteuerte Aggregation ("self-assembly") aus den monomeren Hüllproteinmolekülen entstehen können. RNS und A-Protein spielen dabei keine Rolle. Man kann sich nicht vorstellen, daß 3 Nukleotide pro Hülle und ein A-Protein pro 7-1o Hüllen (siehe III./1b) einen Einfluß auf die Aggregation ausüben können. Alle Informationen, die für den "self-assembly"-Prozess erforderlich sind, müssen demnach in der Struktur des nativen Hüllproteinmoleküls enthalten sein (49).

2. Rolle des A-Proteins bei der Rekonstitution von infektiösen Phagen

Es gibt zwei Möglichkeiten, wie die Bildung von infektiösen Phagen aus RNS, Hüllprotein und A-Protein erfolgen kann.
Entweder wird die Nukleinsäure in eine vorgebildete Hülle eingeordnet, oder durch Wechselbeziehungen zwischen RNS und dem Protein setzt sich der Phage schrittweise zusammen. Ein Sonderfall letzterer Möglichkeit wäre die Bildung der Proteinhülle um ein RNS-Knäuel als Kristallisationspunkt. KELLENBERGER glaubt zum Beispiel, daß nach diesem Prinzip die DNS-haltigen Köpfe der T4-Phagen gebaut werden (5o). Auf Grund dieser Überlegungen wurden die folgenden Rekonstitutionsexperimente ausgeführt.

Bei den ersten Rekonstitutionsversuchen wurden zunächst 40 µg fr-RNS, 60 µg Hüllprotein ^{35}S-markiert und 6 µg A-Protein gemischt und gegen TS-Puffer pH 9,0 , 1 % Mercaptoaethanol, 0,01 m $MgCl_2$ dialysiert. Da kein Infektiositätsanstieg zu verzeichnen war, wurde der Ansatz auf einen CsCl-Gradienten gegeben um zu prüfen, ob sich "defekte" Partikel gebildet hätten. Als Kontrollwert wurde dazu parallel eine Rekonstitution ohne A-Protein durchgeführt und analysiert (Abb.17).

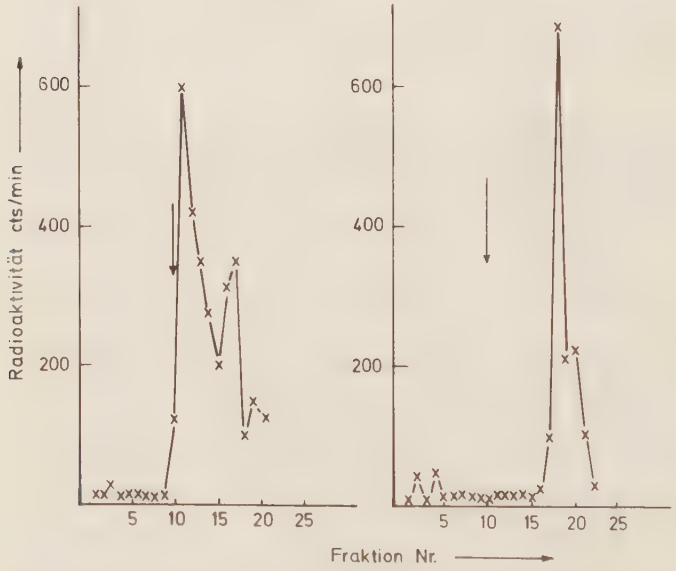


Abb. 17 :

CsCl-Gradient zur Dichtebestimmung der Rekonstitutionsprodukte.
Kontrollwerte ohne A-Protein (links); Rekonstitution mit A-Protein (rechts). Der Pfeil zeigt die Position der Phagen. 35S-markiertes Hüllprotein (x——x).

Die Gradienten zeigen, daß sich mit dem A-Protein zusammen nicht einmal defekte Partikel gebildet hatten, d.h. mit dem A-Protein wurde gleichzeitig etwas zugegeben, das die Rekonstitution verhindert. Es lag nahe, daß das SDS bei der Dialyse nicht vollständig entfernt worden war. Modellversuche mit verschiedenen Konzentrationen SDS im Ansatz bestätigen, dass SDS die Reaggregation hemmt (Abb.18).

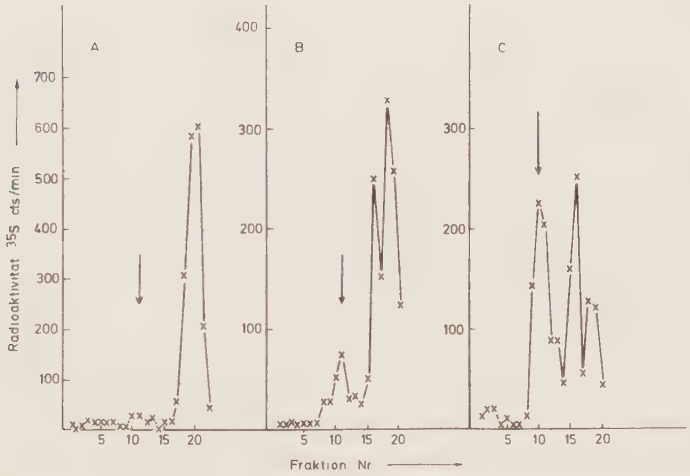


Abb. 18 :
Modellversuch mit verschiedenen Konzentrationen SDS bei der Rekonstitution von defekten Partikeln. Bei der Rekonstitution wurden o,1 % SDS (A), o,o1 % SDS(B) und o,oo1 % SDS (C) zugegeben. Der Pfeil zeigt die Position der defekten Partikel im CsCl-Grad.
35S-markiertes Hüllprotein (x——x).

Deshalb wurde bei allen folgenden Rekonstitutionsversuchen zuerst das A-Protein (6µg) allein 4o Stunden gegen 1/1oo TS-Puffer pH 9,o , o,1 % Mercaptoaethanol dialysiert, um das SDS so weit wie möglich zu entfernen. Dazu wurde dieser Puffer mit niederen Ionenkonzentrationen gewählt, da SDS in Puffern höherer Ionenstärke zu Aggregatbildung neigt und der Dialyseschlauch für diese Aggregate nicht mehr durchlässig ist. Der anschließende Rekonstitutionsversuch - nach Zugabe von RNS und Hüllprotein im Verhältnis 4o µg : 6o µg und Dialyse gegen TS-Puffer pH 9,o , o,o1 m $MgCl_2$, 1 % Mercaptoaethanol - brachte nicht das erhoffte Ergebnis. Obwohl diesmal SDS soweit entfernt worden war, daß sich defekte Partikel bilden konnten (Abb.19), betrug die Infektiosität nur 3,4 x $1o^3$ PFU/ml. Eine Änderung des Puffers verbesserte das Ergebnis nicht (siehe MATERIAL und METHODEN).

Um entscheiden zu können, ob die Rekonstitution von der Reihenfolge der Zugabe der Einzelkomponenten abhängig war, wurden verschiedene Abwandlungen durchgeführt :

1) A-Protein und Hüllprotein und RNS wurden zusammen dialysiert.
2) A-Protein und RNS wurden eine Stunde vordialysiert und dann der Ansatz halbiert; eine Hälfte wurde im Rohrzuckergradienten untersucht, zu der anderen Hälfte wurde Hüllprotein gegeben und dialysiert.

3) A-Protein und RNS-Hüllproteinkomplex I ** wurden 1 Stunde vorinkubiert und dann Hüllprotein zugefügt.
4) A-Protein und vorgebildete defekte Partikel wurden zusammen dialysiert.

Die Mengenverhältnisse betrugen : fr-RNS 4o µg, Hüllprotein 6o µg, A-Protein 6 µg. Lediglich bei 2) wurden doppelte Mengen von RNS und A-Protein eingesetzt. Nach 12 Stunden Dialyse gegen TS-Puffer pH 9,o bei 4^{o}C traten bei 1), 2) und 3) zwischen 1 x $1o^{3}$ und 3 x $1o^{3}$ PFU/ml auf, während bei 4) und in Kontrollversuchen (A-Protein allein, RNS und Hüllprotein ohne A-Protein) weniger als $1o^{2}$ PFU/ml gebildet wurden. Die für jeden Versuch eingesetzte RNS-Menge hätte theoretisch für 2 x $1o^{13}$ PFU/ml ausgereicht. Die eine Hälfte von Ansatz 2) wurde im Rohrzuckergradienten zentrifugiert um zu sehen, ob es analog zu dem RNS-Hüllproteinkomplex I einen A-Protein-RNS-Komplex gibt. Aber weder unter diesen Bedingungen (TS-Puffer pH 9,o) noch durch Dialyse gegen TS-Puffer 7,6 , o,o1 m MgCl oder TMK-Puffer pH 7,6 bindet A-Protein an RNS.
Schließlich wurde untersucht, ob es gelingt, RNS in vorgeformte leere Hüllen einzuordnen.

** SUGIYAMA hatte gefunden, daß einige Moleküle Hüllprotein an RNS gebunden werden. Diesen Komplex hat er Komplex I genannt. Er spielt zumindest in vitro bei der Regulation der Proteinsynthese eine wichtige Rolle (51).

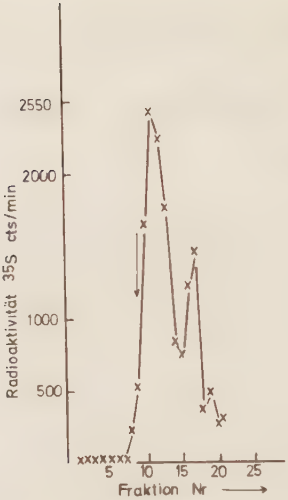


Abb. 19 :

Rekonstitution von defekten Partikeln und infektiösen Phagen mit A-Protein.
Der Pfeil zeigt die Position der Phagen im CsCl-Grad.
35S-markiertes Protein (x——x).

Zu je 40 µg RNS wurden 60 µg leere Proteinhüllen (^{35}S-markiert) gegeben und gegen folgende Puffer bei 37°C und 4°C 2 Stunden, bzw. 12 Stunden dialysiert :

1) 0,02 m Phosphatpuffer pH 7,6 ± 0,01 m MgCl;

2) TS-Puffer pH 7,6 und pH 9,0 ± 0,01 m MgCl.

Nach einer CsCl-Gleichgewichtszentrifugation wurde die Dichte der ^{35}S-haltigen Fraktionen bestimmt. Da alle radioaktiven Fraktionen die Dichte der leeren Hüllen aufwiesen (1,30 g/ml), war unter keiner der gewählten Bedingungen RNS in die Hülle eingeschleust worden.

C. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass der Bakteriophage fr neben RNS und Hüllprotein noch ein histidinhaltiges zweites Protein enthält. Dieses sogenannte A-Protein wurde näher charakterisiert. Sein Molekulargewicht, bestimmt durch Acrylamidgelelektrophorese, beträgt 41 5oo ± 3 %. In einer Phagenpopulation trifft durchschnittlich auf einen Phagen ein A-Protein, dessen Anteil am ganzen Phagen sich dann auf 1 % beläuft.

Mit einer eigens dafür entwickelten Methode wurde das A-Protein isoliert. Bei Rekonstitutionsversuchen mit RNS, Hüllprotein und A-Protein wurde gegenüber den Kontrollwerten ein Anstieg der Infektiosität erzielt.

Das Verhältnis fr-RNS-Moleküle zu infektiösen Phagen betrug $1o^{13}$ zu $1o^{3}$. Eine zeitliche Reihenfolge der Virusbildung konnte nicht bewiesen werden.

Es gelang ausserdem, in vitro aus den monomeren Hüllproteinuntereinheiten des fr-Phagen nukleinsäurefreie Proteinhüllen zu reaggregieren. Serologische Untersuchungen bestätigten, dass die Proteinstrukturen der Hüllen und Phagen sehr ähnlich, wenn nicht identisch sein müssen. Phagen und Proteinhüllen wurden nach Kriterien wie Verhalten im elektrischen Feld, Sedimentationsverhalten im CsCl- und Rohrzuckergradienten, Aussehen im Elektronenmikroskop, verglichen.

D. DISKUSSION

Der Phage besteht aus den 3 Komponenten Hüllprotein, A-Protein und RNS. Da man diese isolieren kann, müßte es möglich sein, die Virusbildung in vitro nachzuvollziehen und dabei die Funktion der einzelnen Komponenten zu ermitteln. Die Rekonstitution von leeren Proteinhüllen ohne RNS und A-Protein beweist, dass die Form und, mit Einschränkungen, auch die Größe des Virus durch die Eigenschaften des Hüllproteinmoleküls bestimmt werden. Das Ergebnis sagt nicht aus, ob A-Protein in die Proteinhülle eingebaut wird, oder ob es im Inneren des Phagen an RNS gebunden ist.

Während wir in allen unseren Hüllenpräparaten im Elektronenmikroskop nur Partikel mit etwa gleichem Durchmesser (260 Å) gesehen haben, findet HOHN (52) ungefähr 2 % Hüllen mit 160 Å Durchmesser. Die Gründe für diese unterschiedlichen Befunde sind nicht klar. Möglicherweise verhindert in vivo die RNS solche Abweichungen, indem sie einen "Kern" bestimmter Größe bildet, um den die Proteinhülle gebaut wird. Man kann sich vorstellen, dass diese Faltung der RNS allein durch die hohe Ionenkonzentration der Zelle erfolgt, damit würde ich ein Faktor erübrigen, der für die Anordnung der RNS im Phagen verantwortlich ist. Diese Annahme wird durch die in vitro-Rekonstitution eines hochinfektiösen kubischen

Pflanzenvirus (cowpea chlorotic mottle virus) gestützt (39); denn dieses Virus besteht nur aus den zwei Komponenten RNS und Hüllprotein.
Pflanzenviren und der fr-Phage gelangen auf verschiedene Weise in die Wirtszelle. Während erstere infolge einer Verletzung der Epidermis in die Pflanze eindringen, haften die fr-Phagen an die F-Pili der Wirtszelle an und schleusen durch jene ihre RNS ein. Dieser Unterschied weist auf die mögliche Funktion des A-Proteins hin und erklärt, warum die Amber-Mutante und die rekonstituierten defekten Partikel nicht infektiös waren. Das A-Protein übernimmt die Funktion eines Rezeptors und ermöglicht die Anhaftung der Phagen an die F-Pili, die Voraussetzung für eine Infektion der Bakterien. Da aber die defekten Partikel, die kein A-Protein besitzen, nicht mehr an die Wirtszelle adsorbieren können, entfällt die Voraussetzung für eine Infektion. Damit das A-Protein aber die Rezeptorfunktion ausüben kann, muß es in die Proteinhülle eingebaut sein.

Es gelang nun tatsächlich aus A-Protein, Hüllprotein und RNS in vitro infektiöse fr-Phagen zu bilden. Auf etwa $1o^{13}$ fr-RNS-Moleküle kamen $1 \times 1o^{3}$ infektiöse Partikel. Bei ROBERTS (53), der die Rekonstitution am R17 durchführte, betrug das Verhältnis RNS-Moleküle zu infektiösen Phagen $1o^{6}$ bis $1o^{7}$. Doch auch dieses Ergebnis

bleibt unbefriedigend, bedenkt man, dass bei Pflanzenviren mit fast 1oo % Ausbeute gerechnet werden kann (39).

Als Erklärung für den geringen Anstieg der Infektiosität trotz Anwesenheit des A-Proteins gibt es zwei Möglichkeiten : Entweder war das A-Protein nach der Isolierung nicht mehr nativ oder aber wurden die Bedingungen für die Rekonstitution nicht optimal gewählt. Da mit einem der verwendeten Puffer Proteinbiosynthese in vitro nachvollzogen werden kann, sollte man erwarten, daß dieser Puffer dem Zellmilieu entspricht und daher auch für eine Rekonstitution geeignet ist. Es muß deshalb angenommen werden, daß die Renaturierung des A-Proteins nach der Isolierung nicht vollständig gelang. Das große Problem bei der Isolierung des A-Proteins besteht darin, dass denaturierende Agentien wegen des starken Adsorptionsvermögens des A-Proteins benutzt werden müssen. Dazu kommt, daß ein Protein mit einem Molekulargewicht von etwa 41 ooo nicht so leicht renaturiert werden kann wie eine kleinere Peptidkette. Als Voraussetzung für weitere Rekonstitutionsexperimente muß deshalb ein Weg gefunden werden, das A-Protein vollständig zu renaturieren.

Bei der geringen Infektiosität, die nach der Rekonstitution auftrat, lassen sich schwerlich Aussagen über eine zeitliche Reihenfolge bei der Bildung des Virus machen. Sicher scheint nur zu sein, daß die leeren Hül-

len keine Vorläufer bei der Virusbildung sein können. Ob das A-Protein mit der RNS einen Komplex bildet, kann nicht entschieden werden. In dem beschriebenen Versuch war das nicht der Fall. Solange ein Test für die Nativität des A-Proteins fehlt, bleibt es ungeklärt, ob das A-Protein tatsächlich nicht mit der RNS bindet. Um die biologische Funktion des A-Proteins einwandfrei zu bestimmen, müssen noch Bedingungen gefunden werden, bei denen ein signifikanter Anstieg der Infektiosität zu verzeichnen ist, wenn RNS, Hüllprotein und A-Protein in vitro zusammengegeben werden.

E. MATERIAL UND METHODEN

1. Bakterienstämme und Bakteriophagen :

Alle Bakterienstämme und der fr-Phage wurden von Herrn Dr. T. HOHN zur Verfügung gestellt. Zur Züchtung von nicht radioaktiven Phagen und von ^{35}S- und ^{32}P-markierten Phagen wurde der Bakterienstamm E. coli 15o1 (F^+, RNase$^-$)verwendet. ^{3}H-Histidin-Phagen wurden in dem Bakterienstamm E. coli HfrU (Vit. B_1^-, His^-) vermehrt. Für den Protoplastentest wurde E. coli Hfr C64 verwendet.

2. Medien und Puffer :

S-Medium enthält pro Liter :

4,6 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, 1,5 g KH_2PO_4, o,5 g Natriumcitrat $\cdot$ 5 1/2 H_2O, 1 g $(NH_4)_2 SO_4$, o,1 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1 g Glucose, 2o mg Vit. B_1, $1o^{-4}$m $CaCl_2$.

TS-Puffer :

o,o2 m Tris-HCl pH 7,6 oder pH 9,o , o,15 m NaCl.

TMK-Puffer :

o,o1 m Tris-HCl pH 7,6, o,o1 m Mg-Acetat, o,o8 m KCl.

3. Chemikalien und biochemische Präparate :

Chemikalien	Firma
L-^{3}H-Histidin (Tritium in 2- und 5-Stellung	Firma Buchler
^{35}S als Sulfat, trägerfrei	Firma Buchler
^{32}P als Phosphat, trägerfrei	Firma Buchler

fr-Antiserum stellte freundlicherweise Dr. H.D. Schlumberger zur Verfügung.

4. Präparation von fr-Phagen :

Die Phagen wurden nach Angaben von HOFFMANN-BERLING (11) und KNIPERS und HOFFMANN-BERLING (54) gezüchtet. Reinigung und Isolierung wurden folgendermaßen abgewandelt : Nachdem 5o l Phagenkultur 4 Stunden hochgewachsen war, wurde sie auf ungefähr 5°C abgekühlt und sofort in einer Sharples-Durchlaufzentrifuge abzentrifugiert, um aus dem Ansatz Bakterienbruchstücke und nicht lysierte Bakterien zu entfernen. Mit der Ultrafiltrationsmethode (55) wurde der Ansatz auf 2 l, und nach einer Zentrifugation in einer Sorvall-Zentrifuge (3o Minuten bei 15 ooo Upm) auf 3oo ml eingeengt. Im Rotor Nr. 21 der Spinco-Ultrazentrifuge wurden die Phagen in 7 ml einer CsCl-Lösung mittlerer Dichte von 1,4 hineinzentrifugiert (6 Std. bei 2o ooo Upm). Der Überstand wurde abgesaugt und die CsCl-Lösung, welche die Phagen enthielt, mit CsCl auf eine Dichte von 1,42 eingestellt und im Rotor Ti5o 18 Stunden bei 45 ooo Upm zentrifugiert. Die Phagenbande wurde isoliert, gegen TS-Puffer pH 7,6 dialysiert und nochmals im Ti5o-Rotor über einen CsCl-Gradienten gereinigt. Von 5o l Medium erhielt man 1,5 g fr-Phagen.

5. Präparation von radioaktiv markierten Phagen :

a) ^{3}H-Histidin-Phagen

Eine Übernachtkultur von E. coli HfrU in S-Medium, dem noch 2o µg/ml Vitamin B_1, 2o µg/ml von 19 Aminosäuren und 6 µg/ml Histidin zugesetzt worden waren, wurden in dem gleichen Medium bei 37°C im Schüttelkasten bis zu $1o^8$ Bakterien/ml hochgezüchtet. 1o ml dieser Kultur wurden durch einen bakterienundurchlässigen Membranfilter MF 5o (Membranfilter AG Göttingen) abgesaugt, und die Bakterien mit 3o ml S-Medium nachgewaschen, um das restliche Histidin zu entfernen. Das Filter wurde in 7 ml 1 1/2-fach konzentriertem S-Medium suspendiert; der Bakterientiter betrug dann 1,5 x $1o^8$ ml. Zu dieser Kultur wurden gegeben :
L-^{3}H-Histidin 1,5 ml = 1,5 mC (spez. Aktivität 258 mC/mg), L-Histidin (nicht radioaktiv) 3o µg, Vitamin B_1 12o µg, 19 L-Aminosäuren (ausgenommen Histidin) 12o µg/Aminosäure, ^{32}P(als Phosphat) trägerfrei, fr-Phagen 1,2 x $1o^{1o}$.
(Diese spezifischen Aktivitäten im Medium waren von Histidin 2 x $1o^9$ cts/min ^{3}H/µmol, und von Phosphat 2,8 x $1o^6$ cts/min ^{32}P/µmol). Dieser Ansatz wurde 4 Std. bei 37°C im Schüttelkasten inkubiert, die Bakterien dann mit einigen Tropfen Chloroform nachlysiert, der Titer bestimmt, und die Phagen über 2-3 vorgeschichtete gemischte Rohrzucker-CsCl-Gradienten gereinigt (siehe E./15.). Die Phagenbande wurde refraktometrisch und durch die ra-

dioaktive Doppelmarkierung nachgewiesen. CsCl wurde durch 2o-stündige Dialyse gegen TS-Puffer pH 7,6 entfernt. Die Phagen lagerten bei 2°C im Kühlschrank.

b) ^{32}P- und ^{35}S-markierte Phagen :

Die Phagen wurden nach bekannten Vorschriften gezüchtet (17,56). Die Reinigung erfolgte in Abänderung über gemischte Rohrzucker-CsCl-Gradienten.

6. Acrylamidgelelektrophorese :

Die Methodik der Gelbereitung ist in der Literatur beschrieben (33, 37, 57). Acrylamid wurde vor Gebrauch in Chloroform umkristallisiert.

a) 7,5%iges Acrylamidgel für analytische Trennung bei pH 7,2 :

1) Zusammensetzung :

7,5 % Acrylamid,

o,2 % N, N'-Methylenbisacrylamid (Bis),

o,1 m Phosphat pH 7,2,

o,o4 % N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (Temed),

o,1 % SDS,

o,o7 % Ammoniumperoxodisulfat (Per).

2) Dauer der Polymerisation : 1 Std. bei 2o°C.

3) Elektrodenpuffer : o,1 m Phosphat pH 7,2 , o,1% SDS.

4) Strom : 3o mA/cm^2.

5) Laufzeit : 4-6 Std. bei Zimmertemperatur.

6) Abmessung der Gele : 6 cm x o,2 cm^2, für Molekulargewichtsbestimmung 9 cm x o,2 cm^2.

7) Bestimmung der Radioaktivität nach P.V. TISCHLER und C.J. EPSTEIN (58).

Alle Prozentangaben bedeuten Gewicht/Volumen.

b) 5%iges Acrylamidgel für analytische Trennung bei pH 11,5:

1) Zusammensetzung des Geles : 5 % Acrylamid, o,2 % Bis, o,1 m Natriumchlorid, o,o4 m Glycin/NaOH pH 11,5 , o,o4 % Temed, o,1 % SDS, o,o7 % Per.
2) Dauer der Polymerisation : 1 Std.
3) Elektrodenpuffer : o,o4 m Glycin/NaOH pH 11,5 , o,1 m NaCl, o,1 % SDS.
4) Strom : 3o mA/cm^2.
5) Laufzeit : 1o Stunden.
6) Abmessung der Gele : 6 cm x o,2 cm^2.
7) Bestimmung der Radioaktivität : siehe E.6a/7.

c) 7,5%iges Acrylamidgel für präparative Isolierung :

1) Zusammensetzung : siehe E./6a/1.
2) Dauer der Polymerisation : 3 Stunden bei 2o°C.
3) Elektrodenpuffer : siehe E./6a/3.
4) Elutionspuffer : o,1 m Phosphatpuffer pH 7,2 , o,o1 % Mercaptoaethanol, o,1 % SDS.
5) Strom : 2o mA/cm^2.
6) Laufzeit : 15 Stunden.
7) Abmessung der Gele : 8 cm x 1o cm^2.

7. Spaltung des Phagen für analytische Trennung auf Gelelektrophorese :

Zu je 1oo µg fr-Phagen wurden jeweils $1o^4$ cts/min ^{3}H-Histidin-markierte Phagen bzw. 5 x $1o^4$ cts/min ^{35}S-markierte Phagen gegeben und mit TS-Puffer pH 7,6 auf ein Volumen von 4oo µl ergänzt. Die beiden Ansätze dialysierten 3 Std. bei 2o°C gegen o,o4 m Glycin/NaOH-Puffer pH 11,5 , o,1 % SDS, o,1 % Mercaptoaethanol. Anschließend wurden die Proben halbiert. Ein Teil wurde sofort der Elektrophorese bei pH 11,5 unterworfen, der Rest wurde 2o Stunden bei 2o°C gegen o,o2 m Phosphatpuffer pH 7,2 , o,1 % SDS, o,1 % Mercaptoaethanol dialysiert (3x Wechsel des Außendialysates) und dann bei pH 7,2 elektrophoretisch aufgetrennt.

8. Spaltung der Phagen für Isolierung des A-Proteins :

8o mg Phagen (in 2 ml TS-Puffer pH 7,6), ^{35}S-markierte Phagen (2,5 x $1o^5$ cts/min) und ^{3}H-Histidin-markierte Phagen (2x $1o^4$ cts/min) wurden bei 2o°C 3 Std. gegen o,o4 m Glycin/NaCl Puffer pH 11,5 , o,1 % SDS, o,1 % Mercaptoaethanol und anschließend 2o Stunden bei 2o°C bei zweimaligem Pufferwechsel gegen o,o1 m Phosphatpuffer pH 7,2 , o,1 % SDS, o,1 % Mercaptoaethanol dialysiert. Das Volumen der Lösung sollte 3 ml nicht übersteigen. Vor dem Auftragen wurden o,2 ml 4o%ige Rohrzuckerlösung und o,2 ml Bromphenolblaulösung zugesetzt.

9. Isolierung des A-Proteins :

Nach dem Auftragen der Phagen auf das Gel (8 cm lange Säule) wurde bei einem konstanten Strom von 1oo mA solange gewartet, bis der Farbstoff vollkommen in das Gel eingedrungen war, danach wurde der Strom auf 2oo mA erhöht. Sobald die Farbstoffbande aus dem Gel wanderte, wurde begonnen Fraktionen zu sammeln. Eine Fraktion enthielt 2 ml, die Tropfgeschwindigkeit betrug 1o ml/Stunde; ein vollständiger Lauf dauerte etwa 15 Stunden. Die Kühlung während der Vorelektrophorese und des Hauptlaufes war auf 3o°C eingestellt. Von o,1 ml jeder Fraktion wurde die Radioaktivität bestimmt und die Fraktionen mit dem besten ^{3}H : ^{35}S-Verhältnis durch Dialyse gegen eine 25%ige Polyaethylenglykollösung in o,o1 m Phosphatpuffer pH 7,2 , o,1 % SDS, o,1 % Mercaptoaethanol auf 1,5 ml eingeengt. Die Konzentrate zweier Läufe wurden vereinigt und in gleicher Weise auf einer 4 cm kürzeren Gelsäule einer zweiten Elektrophorese unterworfen. Die Fraktionen mit dem höchsten ^{3}H-Anteil wurden nochmals konzentriert und das erhaltene Protein einer analytischen Gelelektrophorese unterzogen. Die Ausbeute an ^{3}H betrug 15 % der eingesetzten Radioaktivität.

1o. Essigsäurespaltung der Phagen nach FRAENKEL-CONRAT (4o) und Bildung der leeren Hüllen :

1 Volumen 2-5%iger fr-Suspension wurde im Eisbad mit 2 Volumen Eisessig versetzt und der Ansatz unter gele-

gentlichem Schütteln 15 Minuten im Eisbad gelassen. Nach einer niedertourigen Zentrifugation (15 Min. bei 3o ooo Upm in einer Stock-Zentrifuge) wurde der klare Überstand 1 : 1 mit Wasser verdünnt und die Lösung durch hochtourige Zentrifugation nachgereinigt (2o Min. bei 3o ooo Upm). Daran schloss sich eine Reinigung über Sephadex G 5o oder Biogel P 3o (Säule 3o x 1,5 cm) mit 3o%iger Essigsäure als Elutionsmittel an. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden durch Druckdialyse oder Dialyse gegen eine 25%ige wässrige Polyaethylenglykollösung bis zu ungefähr 1-2 mg/ml Protein konzentriert. Die Essigsäure wurde durch Dialyse gegen Wasser entfernt (etwa 1o Std.). Mit o,o2 n NaOH wurde die Proteinsyspension auf pH-Werte zwischen 7 und 8 gebracht und anschliessend 12 Std. gegen o,o2 m Phosphatpuffer pH 7,6 , o,15 m NaCl dialysiert. Konzentration und Reinheit des Hüllproteins wurden durch UV-Absorption bei 28o mμ bestimmt (42). Als Lösungsmittel wurde immer 3o%ige Essigsäure verwendet. Alle Präparationen wurden im Eisbad oder bei 4°C durchgeführt.

11. Messung der elektrophoretischen Beweglichkeit von Phagen und leeren Hüllen

Hüllenkonzentration 1,9 mg/ml, Phagenkonzentration 2,5 mg/ml;

3 Läufe mit verschiedenen Puffern :

1) o,o2 m Phosphatpuffer pH 5,5 , o,o3 m NaCl
2) o,o2 m Phosphatpuffer pH 8,o , o,o3 m NaCl
3) o,o2 m NaOH/Glycin pH 1o,5 , o,o3 m NaCl.

Laufzeit : 45 Minuten.

Spannung : 25o Volt.

Färbung : Ponceau-S-Lösung (o,2 % Ponceau, 3% Trichloressigsäure, 3 % Sulfosalicylsäure).

12. Bestimmung der Antikörper-Bindungskapazität von Phagen und leeren Hüllen

465 µg künstliche leere Hüllen und 665 µg Phagen (entsprechend 465 µg Protein) in 2 ml o,o2 m Phosphatpuffer pH 7,2 , o,15 m NaCl bildeten die Ausgangslösung für eine Verdünnungsreihe. Je ein ml der Ausgangslösung wurde mit 1 ml Phosphatpuffer verdünnt, davon wieder 1 ml zu 1 ml Phosphatpuffer gegeben usw. Die Verdünnungsreihe enthielt 9 Gläschen. Zu jedem dieser Gläschen wurde o,1 ml fr-Antiserum pipettiert und gut geschüttelt. Der Ansatz blieb 2 Stunden bei Zimmertemperatur und 4o Stunden bei 4°C stehen. In der Kälte wurde das Präzipitat abzentrifugiert (3o Min. in der Stock-Zentrifuge bei 3 ooo Upm bei 4°C), der Überstand dekantiert und das Praezipitat zweimal mit Puffer nachgewaschen. Mit jeweils 1 ml o,1 n NaOH wurde der Niederschlag gelöst und nach LOWRY die optische Dichte bestimmt (48).

13. Rekonstitutionsversuche von infektiösen Phagen

Verwendet wurden an Ausgangssubstanzen pro Ansatz : 6o µg Hüllprotein(in o,o1 % Essigsäure oder in o,o2 n NaOH; Isolierung des Hüllproteins nach E./1o.), 4o µg

RNS in TS-Puffer pH 7,6 , 6 µg A-Protein in 1/1oo TS-Puffer pH 7,6 , o,1 % Mercaptoaethanol. Das Volumen betrug 25o µl. Die Ansätze wurden gegen folgende Puffer dialysiert :

1.) TS-Puffer pH 7,6 ± o,o1 m $MgCl_2$ ± 1 % bzw. o,1 % Mercaptoaethanol.

2.) TS-Puffer pH 9,o ± o,o1 m $MgCl_2$ ± 1 % bzw. o,1 % Mercaptoaethanol.

3.) TMK-Puffer pH 7,6 ± 1 % bzw. o,1 % Mercaptoaethanol.

4.) o,o2 m Phosphat pH 7,6 , o,15 m NaCl ± o,o1 m $MgCl_2$ ± 1 % bzw. o,1 % Mercaptoaethanol.

Dauer der Dialyse : 12 Std. bei 4°C oder 2 Std. bei 37°C.

14. fr-RNS-Präparation :

Phagen-RNS wurde durch Extraktion mit Phenol gewonnen (9). Dem Phenol war Macaloid zugesetzt worden (59), dadurch wurde eine jederzeit reproduzierbare Ausbeute an infektiöser RNS garantiert. Entweder wurde die RNS direkt durch Fällung der wässrigen Phenolphase mit dreifachem Volumen Natriumacetat gepufferten Isopropanols bei -35°C gewonnen, oder aber die wässrige Phase vor der Alkoholfällung über eine DEAE-Cellulose-Säule gegeben und mit einem steigenden Salzgradienten die RNS eluiert (6o). Letztere Methode wurde angewendet, um Spuren von Macaloid zu entfernen. Die Infektiosität der RNS wurde mit dem Protoplastentest bestimmt (61, 62). Das Verhältnis

RNS-Moleküle zu PFU lag zwischen $1o^6$ und $1o^7$ (63).

15. CsCl- und Rohrzuckergradienten :

a) Gemischte Rohrzucker-CsCl-Gradienten zur Reinigung radioaktiver Phagen :
Je nach Volumen der Phagensuspension wurden folgende Gradienten gebildet :
1) Je o,9 ml CsCl-Lösung (in o,o2 m Tris pH 7,2) der Dichten 1,5 , 1,4 und 1,3 sowie o,7 ml 2o%ige Rohrzuckerlösung wurden übereinandergeschichtet, die Probe aufgetragen (maximal 1 ml), mit o,2 ml Paraffin überschichtet und 5 Std. bei 4o ooo Upm im Rotor SW 5o in einer Spinco-Ultrazentrifuge bei 4^oC zentrifugiert.
2) Je 2 ml CsCl-Lösung der Dichten 1,5 , 1,4 , 1,3 und 2 ml 2o%ige Rohrzuckerlösung wurden übereinandergeschichtet und maximal 3 ml Probe aufgetragen. Zentrifugation : 8 Std. im Rotor SW 41 bei 35 ooo Upm bei 4^oC.

b) CsCl-Gradient zur Dichtebestimmung von leeren Hüllen, defekten Partikeln und Phagen :
Zu 4,5 ml einer CsCl-Lösung (in o,o2 m Tris pH 7,2) der mittleren Dichte von 1,3 bzw. 1,42 wurden o,2 ml Probe gegeben, mit o,2 ml Paraffin überschichtet und 22 Std. bei 34 ooo Upm im Rotor SW 39 bei 4^oC zentrifugiert. Die Dichte der einzelnen Fraktionen wurde mit dem Refraktometer bei $2o^oC$ bestimmt.

c) Lineare Rohrzuckergradienten :

Je 2 ml 5%ige und 2o%ige Rohrzuckerlösung (in o,o2 m Tris pH 7,2) wurden kontinuierlich gemischt. Zentrifugation zur Isolierung von Hüllen : 7o Min. bei 4o ooo Upm im Rotor SW 5o.

16. Messung der Radioaktivität :

Radioaktivitätsmessungen wurden in einem Flüssigkeits-szintillationszähler der Firma Packard (Tri-Carb, Modell 3oo3) ausgeführt.

Szintillationsflüssigkeit :

1) 4,o g Butyl-PBD (Firma Ciba)
   8o,o g Naphthalin
   1 l Dioxan
2) 3,o g Butyl-PBD
   1 l Toluol

Ausbeute an ^{3}H-Radioaktivität 14,3 % (in Toluol),
Ausbeute an ^{32}P-Radioaktivität 1oo % (in Toluol).

17. Elektronenmikroskopie :

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden mit Hilfe von Herrn Berger und Herrn Dr. Frank auf einem Siemens-Elmiskop I A durchgeführt. Die Negativkontrastierung erfolgte durch Uranylacetat oder Phosphorwolframsäure.

F. LITERATURVERZEICHNIS

1. B. Helwig, "Moderne Arzneimittel", Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart (1967).

2. I. Tamm und H.J. Eggers, in "Viral and Rickettsial Infections of Man". (Hrsg. F.L. Horsfall und I. Tamm). 4. Ausgabe.

3. D.L.D. Caspar und A. Klug, Cold Spring Harbor Symp. 27, 1 (1962).

4. N.D. Zinder, Ann. Rev. Microbiol. 19,455 (1965).

5. H. Hoffmann-Berling, H.C. Kaerner und R. Knippers, Advan. in Virus Research, 12, 329 (1966).

6. H. Hoffmann-Berling, H. Dürwald und I. Beulke, Z. Naturforsch. 18 b, 892 (1963).

7. C.C. Brinton, P. Gemski und J. Carnahan, Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 52, 776 (1964).

8. R.C. Valentine, H. Wedel und K.A. Ippen, Biochem. Biophys. Res. Comm. 21, 277 (1965).

9. D.A. Marvin und H. Hoffmann-Berling, Z. Naturforsch. 18 b, 884 (1963).

10. H. Frank, persönliche Mitteilung.

11. H. Hoffmann-Berling, D.A. Marvin und H. Dürwald, Z. Naturforsch. 18 b, 876 (1963).

12. B. Wittmann-Liebold, Z. Naturforsch. 21 b, 1249 (1966).

13. C. Weissmann, L. Simon und S. Ochoa, Proc. Nat. Acad.Sci. Wash. 49, 407 (1963).

14. I. Haruna, K. Nozu, Y. Ohtaka und S. Spiegelmann, Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 50, 905 (1963).

15. J.T, August, S. Cooper, L. Shapiro und N.D. Zinder, Cold Spring Harbor Symp. 28, 95 (1963).

16. M.R. Capecchi, J.Mol. Biol. 21, 173 (1966).

17. M. Heisenberg, J.Mol. Biol. 17, 136 (1966).

18. M. Heisenberg und J. Blessing, Z. Naturforsch. 2o b, 859 (1965).

19. J.E. Argetsinger und G.N. Gussin, J.Mol. Biol. 21, 421 (1966).

2o. G.N. Gussin, J.Mol.Biol. 21, 435 (1966).

21. G. Schramm, Naturwissenschaften 31, 94 (1943).

22. G.Schramm und W. Zillig, Z. Naturforsch. 1o b, 493 (1955).

23. H. Fraenkel-Conrat und B. Singer, Biochem. Biophys. Acta 24, 54o (1957).

24. T. Hohn, European J. Biochem. 2, 152 (1967).

25. D. Nathans, M.P. Oeschger, K. Eggen und Y. Shimura, Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 56, 1844 (1966).

26. E. Vinuela, I.D. Algranati und S. Ochoa, European J. Biochem. 1, 3 (1967).

27. K. Eggen, M.P. Oeschger und D. Nathans, Biochem. Biophys. Res. Comm. 28, 587 (1967).

28. K. Weber, Biochemistry 6, 3144 (1967).

29. I.J. Lin, C.M. Tsung und H. Fraenkel-Conrat, J. Mol. Biol. 24, 1 (1967).

3o. W. Konigsberg, K. Weber, G. Notani und N.D. Zinder, J. Biol. Chem. 241, 2579 (1966).

31. M.D. Zinder und P. Kaesberg, J. Mol. Biol. 13, 26o (1965).

32. J. Argetsinger-Steitz, J.Mol.Biol. 33, 937 (1968).

33. A.L. Shapiro, E. Vinuela und J.V. Maizel, Biochem. Biophys. Res. Comm. 28, 815 (1967).

34. Argetsinger-Steitz, J.Mol. Biol. 33, 923 (1968).

35. P. Karlson,"Kurzes Lehrbuch der Biochemie", Thieme-Verlag, 5. Auflage.

36. H.R. Mahler und E.H. Cordes,"Biological Chemistry", Harber International Edition (1967).

37. A.H. Gordon und L.N. Louis, Anal. Biochem. 21,19o (1967).

38. P. Kaesberg, Proceedings of the Edmonton Virus Symposion 241 (1966).

39. J.B. Bancroft und E. Hiebert, Virology 32, 354 (1967).

40. H. Fraenkel-Conrat, Virology 4, 1 (1957).

41. H.K. Schachmann, "Ultracentrifugation in Biochemistry", Academic Press, New York (1959).

42. D. Schubert, Biochim. Biophys. Acta 188, 147 (1969).

43. T. Sugiyama, R.R. Herbert und K.A. Hartmann, J. Mol. Biol. 25, 455 (1967).

44. J.D. Watson, "Molecular Biology of the Gene" (1965).

45. I. Loeb und N.D. Zinder, Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 47, 282 (1961).

46. D. Schubert, R. Herrmann und G. Schramm, Symp. on Interactions between Subunits of Biological Macromolecules, Cambridge (1968).

47. K. Wakabayashi, H. Hotan und S. Asakura, Biochim. Biophys. Acta 175, 195 (1969).

48. O.H. Lowry, N.J. Rosebrough, A.L. Farr und R.J. Randall, J. Biol. Chem. 193 (1951) 265.

49. R. Herrmann, D. Schubert und U. Rudolph, Biochem. Biophys. Res. Comm. 30, 576 (1968).

50. E. Kellenberger, J. Séchaud und A. Ryter, Virology 8, 478 (1959).

51. T. Sugiyama und D. Nakada, Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 57, 1744 (1967).

52. T. Holm, Biochem. Biophys. Res. Comm. 36, 7 (1969).

53. J.W. Roberts und J.A. Argetsinger-Steitz, Proc. Nat. Acad. Sci. Wash. 58, 1416 (1967).

54. R. Knippers und H. Hoffmann-Berling, J. Mol. Biol. 21, 281 (1968).

55. K. Strohmeier, in "Methods in Virology", Vol. II, (Hrsg. K. Maramorosch und H. Koprowski).

56. M.E. Edgell und W. Ginoza, Virology 27, 23 (1965).

57. H.R. Maurer, "Diskelektrophorese", Verlag Walter de Gruyter und Co. (1968).

58. P.V. Tischler und C.J. Epstein, Anal. Biochem. 22, 89 (1968).

59. S. Mandels und G. Bruening, Biochemical Preparations, Vol. 12, 113 (1967).

6o. P.P. Hung, Biochim. Biophys. Acta, 186, 22o (1969).

61. D. Pfeiffer, J.E. Davis und R.L. Sinsheimer, J. Mol. Biol. 1o, 412 (1964).

62. J.H. Strauss, J.Mol. Biol. 1o, 422 (1964).

63. R. Benzinger, H. Delius, R. Jaenisch und P.H. Hofschneider, European J. Biochem. 2, 414 (1967).

Verpflichtet fühle ich mich den Herren Dr. M. Koch, Dr. H. Schaller und Dr. D. Schubert für zahlreiche Anregungen bei der Durchführung der Arbeit.

Fräulein Faiß danke ich für ihre fleißige Mithilfe bei der Präparation der fr-Phagen und der Anfertigung der Gelelektrophoresen.

LEBENSLAUF

24.2.1940	geboren in Nördlingen
1946 - 1959	Besuch der Volksschule und des humanistischen Gymnasiums in Nördlingen
Juni 1959	Abitur
1. Oktober 1959 bis 30. September 1960	Grundwehrdienst bei der Bundeswehr
1. Oktober 1960 bis 30. September 1962	Apothekerpraktikant in der Engel-Apotheke in Nördlingen
WS 1962/1963 bis WS 1965/1966	Studium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität in Tübingen
21. April 1966	Pharmazeutische Prüfung
1. Juni 1966 bis 31. Dezember 1966	Kandidatenzeit in der Tauentzien-Apotheke in Berlin
31. Mai 1967	Approbation als Apotheker
Januar 1967 bis August 1969	Doktorarbeit unter Anleitung von Professor Dr. G. Schramm und Priv.-Doz. Dr. F.A. Anderer am Max - Planck-Institut für Virusforschung in Tübingen.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten :

F.A. Anderer
H. Auterhoff
R.E. Bader
K.G. Bergner
E. Bünning
E. Graf
A. Grahle
M. Hanack
W. Hückel
K. Hummel
H. Krüger
F. Lembeck
K. Mägdefrau
H. Möhrle
E. Müller
W. Rüdorff
W. Schäfer
G. Schramm
H. Ueleke
G. Weitzel